Lokalisation von Zuckerbindungsstellen an chemosensorischen Haaren von Insekten

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Annette Becker
aus Düsseldorf

Düsseldorf 1987

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0046

Lokalisation von Zuckerbindungsstellen an chemosensorischen Haaren von Insekten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Annette Becker

aus Düsseldorf

Düsseldorf 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Peters

2. Berichterstatter: Prof Dr. K.-D. Spindler

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Februar 1987

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung....4
B. Material und Methoden....7
1. Tiermaterial und Verhaltensversuche....7
2. Herstellung der Goldsole....7
a) Herstellung von kolloidalem Gold....7
b) Kopplung von Neoglykoproteinen an Gold....8
c) Inkubationen mit Neoglykoprotein-Gold-Komplexen....9
3. Transmissions-Elektronenmikroskopie....10
4. Raster-Elektronenmikroskopie....13
5. Lichtmikroskopische Untersuchungen und Silberlatensifizierung....13
6. Biochemische Methoden....14
a) Herstellung der Elektrophoresegele....14
b) Herstellung der Proben....15
c) Auftrennung der Proben und Färbung der Gele....16
d) Transblotting auf Nitrozellulose-Folie....17
7. Elektrophysiologische Untersuchungen....19
C. Ergebnisse....20
1. Verhaltensversuche....20
2. Morphologie der Schmeckhaare....23
a) Schmeckhaare von *Periplaneta americana*....23
b) Labellare Schmeckhaare von *Protophormia terraenovae*...27
3. Elektronenmikroskopische Darstellung der Zuckerbindungsstelle....29
4. Quantitative Bestimmung der Zuckerbindungsfähigkeit....32
a) *Periplaneta americana*....32
b) *Protophormia terraenovae*....34
5. Biochemische Eigenschaften der Porensubstanz....40
a) Allgemeines....40
b) Wirkung verschiedener Enzyme....40
c) Wirkung verschiedener Detergentien....41
6. Gelelektrophorese und Transfer auf Nitrozellulose-Folien.42
7. Elektrophysiologische Experimente....47

D. Diskussion.....49
1. Besonderheiten der Schmeckhaare von Insekten.....49
2. Besonderheiten der Riechhaare von Insekten.....57
3. Vergleich mit chemischen Sinnesorganen von Wirbeltieren..61
4. Theoretische Aspekte.....63
5. Ausblick.....65
E. Zusammenfassung.....66
F. Literatur.....68
G. Abbildungsteil.....82
H. Danksagung.....109
I. Lebenslauf.....110

A. Einleitung

Für einen Organismus ist die Erkennung chemischer Gegebenheiten in seiner Umwelt von existentieller Bedeutung. Die Fähigkeit, chemische Reize wahrzunehmen, gibt es bei relativ einfachen Lebensformen wie Bakterien oder Protozoen ebenso wie bei höher differenzierten Organismen, bei denen im Allgemeinen besondere Sinnesorgane ausgebildet sind. Insekten haben spezialisierte Sinneshaare, die aus Sinneszellen, Hüllzellen und kutikularen Hilfsstrukturen aufgebaut sind; Sinnes- und Hüllzellen gehen durch differentielle Zellteilungen aus einer gemeinsamen epidermalen Stammzelle hervor (Henke, 1953; Peters, 1965; Ernst, 1972). Man unterscheidet Geruchs- und Kontaktchemorezeptoren. Die Kontaktchemorezeptoren zeichnen sich durch einen terminalen Porus aus, der auf komplizierte Weise untergliedert sein kann; Ausläufer der Sinneszellen reichen bis in die unmittelbare Nähe des Porus. Obwohl beispielsweise Schmeckhaare an den Labellen von Fliegen schon von Leydig (1859) erstmals beschrieben wurden und in vielen Fällen Ultrastruktur (Überblick bei Zacharuk, 1980) und Physiologie (Hodgson *et al.*, 1955; Morita und Yamashita, 1969) bekannt sind, gibt es über die Primärprozesse an Geschmackssensillen von Insekten bislang nur Vermutungen. Das erste mathematische Modell, die "Geschmacksgleichung" von Beidler (1954), dient als Grundlage für die meisten Theorien zur Funktion von Geschmackssinnesorganen. Das am häufigsten angewandte Modell für den Funktionsmechanismus von Schmeckhaaren, das aber nach wie vor unbewiesen ist, ist folgendes: Die Reizsubstanz wird durch den Porus an der Haarspitze aufgenommen und gelangt durch Diffusion zu den Dendriten der Sinneszellen. In der Dendritenmembran befinden sich Rezeptorproteine, die spezifisch z.B. Zucker erkennen und binden und dadurch eine Konformationsänderung erfahren. Diese soll dann zu einer Änderung der Leitfähigkeit der Dendritenmembran führen und bei ausreichender Reizstärke ein elektrisches Signal erzeugen (den Otter, 1981).

Verschiedene Befunde (de Kramer und van der Molen, 1980; Morita, 1971, zit. n. Hansen, 1974) deuten jedoch darauf hin, daß die Arbeitsweise der Schmeckhaare komplizierter ist. Dabei soll die Porenregion eine besondere Rolle spielen (de Kramer und van der Molen, 1980, van der Wolk *et al.*, 1984). Im Porus befindet sich eine Substanz, die sich als Proteoglykan erwies (Pietra und Angioy, 1982). Aufgrund der Eigenschaften von Makromolekülen wäre zu erwarten, daß die Porensubstanz die Diffusion der Reizmoleküle stark behindern würde (Spragg, 1980). Die Latenzzeit zwischen Reiz und elektrischer Antwort dauert zwischen 5 und 20 ms (Beidler, 1975); die Porensubstanz läßt demnach die Reizmoleküle so schnell passieren, daß keine merkliche Verzögerung der Antwort eintritt. Eine weitere Besonderheit der Geschmackssensillen ist, daß ihre Reaktionsbereitschaft durch verschiedene Faktoren wie Hunger, Nahrungsangebot oder auch Hormone beeinflußt werden kann (Blaney et al., 1986).

Ein erster Schritt zu einem besseren Verständnis des Funktionsmechanismus' von Kontaktchemosensillen wäre die morphologische Darstellung der Bindungsstelle von Reizstoffen. Versuche mit radioaktiv markierter Glucose zeigten, daß die Moleküle in die Schmeckhaare eindringen (Hanamori, 1976). Eine autoradiographische Lokalisation des Bindungsortes ist vermutlich wegen der schnellen Metabolisierung von Glucose nicht möglich. Daher wurde versucht, mit einem aus Rinderserumalbumin und Glucose hergestellten sog. Neoglykoprotein, gekoppelt mit kolloidalem Gold als elektronendichtem Marker, eine derartige Lokalisation zu erreichen. Im nächsten Schritt müßten organspezifische Substanzen identifiziert werden, die spezifische Zuckerbindungsfähigkeiten besitzen, ähnlich wie es Dastoli und Price (1966) bereits an Extrakten von Geschmackspapillen des Rindes gelang. Die Möglichkeiten, ein zuckerbindendes Protein aus der Dendritenmembran zu isolieren, sind jedoch sehr gering (Hansen, 1974). In Bezug auf frühere Verhaltensexperimente wäre eine Quantifizierung der Affinität der zuckerbindenden Stellen zu verschiedenen Zuckern wünschenswert. An kolloidales Gold gekoppelte Neoglykoproteine können zur Klärung dieser sehr

unterschiedlichen Fragestellungen auf vielfältige Weise eingesetzt werden. Sie eignen sich für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen; eine Quantifizierung der gebundenen Goldmengen ist photometrisch möglich. Auch elektrophoretisch aufgetrenntes Material läßt sich nach Transfer auf Nitrozellulosefolie mit Neoglykoprotein-Gold-Komplexen auf seine spezifische Zuckerbindungsfähigkeit untersuchen.

B. Material und Methoden

1. Tiermaterial und Verhaltenstests

Alle Untersuchungen wurden an adulten Weibchen von *Periplaneta americana* L. sowie Schmeißfliegen der Art *Protophormia terraenovae* Robineau-Desvoidy durchgeführt. Die in größeren Mengen erforderlichen Schaben wurden freundlicherweise von den Firmen Thompson-Siegel GmbH, Düsseldorf, und Bayer AG, Leverkusen, zur Verfügung gestellt. Die Schmeißfliegen stammten aus der institutseigenen Zucht. Vor allen Versuchen hungerten die Schaben drei bis vier Tage, die Fliegen mindestens vier Stunden.

Die Verhaltenstests mit Schaben wurden mit Gruppen von etwa zwanzig Tieren durchgeführt, die sich in einem Glaskäfig frei bewegen konnten. Für die Bestimmung der Schwellenwerte wurden zwölf Einzeltiere getestet, und zwar nach der von Frings (1946) bzw. Jakinovich Jr. *et al.* (1981) beschriebenen Methode. Die Konzentrationen der Testlösungen betrugen 0,1 M - 1 M in 100 mM-Schritten für Glucose, Galaktose und Mannose und 0,01 M - 0,1 M in 10 mM-Schritten für Saccharose, Fructose und Maltose. Bei Ausschaltexperimenten wurden Schmeckhaare durch Amputation der Spitze des Maxillartasters oder durch Verkleben der Sensillen mit Sekundenkleber funktionsunfähig gemacht. Fliegen wurden in Gruppen von etwa zehn Tieren getestet, und zwar mit derselben Lösung, die in den elektrophysiologischen Experimenten mit Schaben verwendet wurde (s.u.).

RIJKSUNIV. LEIDEN BIBL.

2. Herstellung der Goldsole

a) Herstellung von kolloidalem Gold

Kolloidales Gold mit einem mittleren Korndurchmesser von 17 nm wurde nach den Angaben von Frens (1973) und Horisberger (1979) durch Reduktion von $HAuCl_4 \times 3\ H_2O$ (Merck, Darmstadt). Die Größe der Goldkolloide wird durch die Reduktionsbedingungen bestimmt. Die Herstellung erfolgte in einem silikonisierten Glasgefäß,

indem 900 ml Aqua bidest zum Kochen gebracht, zunächst unter ständigem Rühren 36 ml 1% Natriumcitrat zugegeben und dieser Lösung unter starkem Rühren 2,25 ml 4% wässrige $HAuCl_4 \times 3\ H_2O$ zugesetzt wurden. Nach 30minütigem Kochen unter Rückfluß wurde das weinrote Goldsol in silikonisierte Glasflaschen abgefüllt und bei 1 at im Autoklaven sterilisiert. Für die Kopplung mit Lektinen oder Neoglykoproteinen war es notwendig, das Goldsol mindestens zwei Monate altern zu lassen, da sonst keine Kopplung gelang.

b) Kopplung von Neoglykoproteinen an Gold

Das Gold wurde als elektronendichter Marker für Neoglykoproteine verwendet, und zwar für Rinderserumalbumin mit etwa 32 kovalent gebundenen Glucoseresten - im Folgenden als Glc-BSA bezeichnet (Medac, Hamburg). Ferner wurden Asialofetuin (Sigma, München; aus foetalem Kälberserum), Gal-BSA (im Diabetes-Institut der Universität Düsseldorf synthetisiert) und Peroxidase (Sigma, München; E.C.1.11.1.7., horseradish peroxidase type II) an Gold gekoppelt. Asialofetuin und Gal-BSA tragen Galaktose-Reste, der endständige Zucker der Peroxidase ist Mannose.

Die Spezifität der Bindung wurde durch kompetitive Hemmung mit Mono- und Disacchariden nachgewiesen. Es wurden folgende Zucker getestet: Maltose, Saccharose, Glucose, Fructose, Galaktose und Mannose. Die Zuckerkonzentrationen wurden je nach Experiment variiert.

Entscheidend für das Gelingen der Kopplung von Proteinen an kolloidales Gold sind folgende Faktoren: 1. das Alter des Goldsols, 2. eine ausreichende Menge an Neoglykoprotein, 3. die Ionenstärke des Goldsols und 4. der pH-Wert (Goodman *et al.*, 1981).

Etwa 1 mg des Neoglykoproteins wurde in 1 ml 50 mM NaCl gelöst, zur Sterilisation durch ein 45 µm Minisart-Filter filtriert und unter Rühren zu 100 ml Goldsol gegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde für die Kopplung von Glc-BSA mit 0,1% Essigsäure auf 6,4, für Peroxidase, Gal-BSA und Asialofetuin mit 0,2 M K_2CO_3 auf 7,0 eingestellt. Nach 5 Minuten werden 5 ml steril filtriertes

1%iges Polyethylenglykol (Serva, Heidelberg; MG 17.000 - 20.000 D)zugefügt. Diese Lösung wurde über Nacht bei 4°C aufgehoben. Anschließend wurde das beladene Goldsol bei 18.000 g_{max} abzentrifugiert; der überstand, der ungebundenes Neoglykoprotein enthielt, wurde verworfen. Das Pellet wurde in Citratpuffer (4 ml 1% Na-Citrat-2-hydrat auf 100 ml, pH 6,2, mit Zusatz von PEG) resuspendiert und zweimal mit diesem Puffer gewaschen. Zuletzt wurde das Pellet in ca. 3 ml Citratpuffer aufgenommen und durch Zusatz von 50 µl 0,5% NaN_3 haltbar gemacht.

Das Gelingen der Kopplung wurde mit folgendem Schnelltest nach Horisberger (1979) überprüft: 500 µl des frisch gekoppelten Sols werden mit 100 µl 10% NaCl gemischt. Wenn die Lösung rubinrot bleibt, ist die Kopplung gelungen; schlägt die Farbe jedoch nach blau um, so zeigt dies an, daß die Goldkörner verklumpen, also keine schützende Proteinschicht angelagert haben. Das freie Goldsol ist sehr empfindlich gegenüber dem Einfluß von Ionen, während beladene Goldkörner gegen einwertige Ionen unempfindlich sind. Die Konzentration des mit Neoglykoproteinen gekoppelten Goldsols wurde photometrisch in einer Verdünnung von 1 : 100 mit einem Kontron Uvikon 810 Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 520 nm bestimmt.

Für den Nachweis von Chitin wurde an Gold gekoppeltes Weizenkeim-Agglutinin (WGA) (Serva, Heidelberg) verwendet. Um ein stabiles Lektin-Gold-Konjugat zu erhalten, wurde WGA zunächst an Rinderserumalbumin gekoppelt (Horisberger und Rosset, 1977) und anschließend die Kopplung an kolloidales Gold vorgenommen (Peters et al., 1983).

c) Inkubationen mit Neoglykoprotein-Gold-Komplexen

Die Inkubation der Maxillartaster bzw. Labellen erfolgte in einem mit PBS (phosphate buffered saline, pH 7,4, ohne Zusatz von $MgCl_2$ und $CaCl_2$) verdünnten Neoglykoprotein-Goldsol mit einer optischen Dichte zwischen 0,8 und 1,0 (s.u.) für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde stets frisches Goldsol ohne Zusatz von NaN_3

verwendet. Die Spezifität der Neoglykoproteinbindung wurde durch kompetitive Hemmung mit verschiedenen Zuckern geprüft. Dafür wurden die Präparate 30 Minuten mit einer 0,3 M Zuckerlösung vorinkubiert und danach der Neoglykoprotein-Goldkomplex in der gleichen Konzentration wie im positiven Versuch zugemischt.
Ultradünnschnitte wurden zunächst schwimmend auf PBS 20 Minuten vorgequollen und danach genau wie die Totalpräparate weiterinkubiert. Abschließend wurden sie zweimal 10 Minuten in PBS gespült und der Puffer gründlich mit Aqua bidest abgewaschen.
Für die photometrische Bestimmung wurden die Maxillartaster vor der Inkubation an der Schnittstelle mit Dentalwachs versiegelt, um unspezifische Bindung am Gewebe zu verhindern. Das gebundene Gold wurde durch einstündige Behandlung mit 1% Non-Idet P40 in 0,1 N NaOH abgelöst und seine Konzentration durch Messung der Absorption bei 520 nm bestimmt (Spindler-Barth *et al.*, im Druck).

3. Transmissions-Elektronenmikroskopie

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden Maxillartaster von *Periplaneta americana* und Labellen von *Protophormia terraenovae* mit Neoglykoprotein-Goldsol inkubiert (s.o.). Anschließend wurden die Präparate kurz mit PBS gewaschen, um überschüssiges Goldsol abzuspülen. Da chemische Fixierungsmethoden die Struktur der Sinneshaare nur unbefriedigend erhielten, wurden die Präparate kryofixiert. Diese Art der Fixierung hat sich bei Insektensensillen am besten bewährt (Steinbrecht, 1980). Maxillartaster bzw. Labellen wurden in flüssigem Propan bei -175°C schockgefroren. Zur anschließenden Gefriersubstitution wurden die Objekte zunächst in 80°C kaltes Aceton überführt und nachfolgend in 2% OsO_4 in Aceton fixiert. Aceton sowie die Aceton-OsO_4-Lösung waren mit Molekularsieb (3Å) versehen, um sie wasserfrei zu halten. Damit die Präparate sich während der Transporte von einer Lösung in die nächste nicht erwärmten, wurden sie in gekühlten Stahlgefäßen befördert.

Die öffnung dieser Schrauben wurde für den Transport mit ein wenig feuchtem Zellstoff verschlossen, um zu vermeiden, daß die Objekte beim übergang von Propan in Aceton beim Verdampfen des Propans aus der Schraube geschleudert werden. Die Gefriersubstitution erfolgte in einer Kühlzelle bei -85°C für die Dauer von mindestens 12 Stunden. Nach etwa vierstündigem Auftauen wurden die Präparate in wasserfreiem Aceton gewaschen und anschließend in Araldit eingebettet. Aceton diente gleichzeitig als Intermedium für die Einbettung. Das Gelingen der Fixierung konnte an Semidünnschnitten kontrolliert werden. Diese waren ca. 0,5 µm dick und wurden mit einem Gemisch aus Azur- und Methylenblau gefärbt.
Die Untersuchung der Hüllzellen erfolgte an Material, das mit 2,5% Glutaraldehyd und 0,5 mg/ml Saponin fixiert und mit 2% OsO_4 nachfixiert wurde.
Für Untersuchungen am Ultradünnschnitt wurden die Präparate in Lowicryl K4M, einem wasserlöslichen Einbettungsmittel auf der Basis von Methacrylat, eingebettet (Roth *et al.*, 1981; Fryer *et al.*, 1983). Da bei diesen Untersuchungen Osmium im Gewebe störte, wurden verschiedene Fixierungen mit Aldehyden getestet, von denen sich 1% Glutaraldehyd mit Zusätzen von Saponin und Tannin nach Maupin und Pollard (1983) am besten bewährte. Nach 30minütiger Fixierung bei Raumtemperatur wurden die Präparate über die Alkoholreihe bei ca. 4°C entwässert und über zwei Alkohol-Methacrylat-Mischphasen in Lowicryl K4M, bestehend aus 3,6 g Crosslinker A, 16,4 g Monomer B sowie 0,1 g Benzoin-ethyl-ether als Initiator, eingebettet. Die Polymerisation erfolgte unter UV-Licht bei 0°C. Anschließend werden die Blöckchen noch zwei bis drei Wochen bei Raumtemperatur nachgehärtet und im Exsikkator aufbewahrt.

Der Nachweis von Proteoglykanen erfolgte an kryofixierten Maxillartastern in einer Modifikation der Methoden von Thiéry (1967) sowie Scott und Dorling (1969). Bei Kontrollen erfolgte die Inkubation mit Semicarbazid und Albumose-Silber ohne vorhergehende Oxidation mit $NaJO_4$.

Die Inkubation mit Enzymen erfolgte bei 37°C für vier Stunden. Es wurden folgende Enzymlösungen an Maxillartastern getestet: Chondroitinase ABC aus *Proteus vulgaris* (5 units, Sigma) in 1 ml PBS, pH 8,0, Hyaluronidase aus Schafshoden (450 units, Serva) in 1 ml PBS, pH 4,9 und 2 mg Pronase P aus *Streptomyces griseus* (Serva) in 1 ml PBS, pH 8,0. Kontrollpräparate wurden in PBS, pH 8,0, ohne Enzymzusatz bzw. mit hitzeinaktivierter Pronase P für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Nach gründlichem Abspulen der Enzymlösungen wurden die Maxillartaster mit Glc-BSA-Gold inkubiert und anschließend kryofixiert.

Die Wirkung von Detergentien wurde durch zweistündige Behandlung der Maxillartaster mit 8 M Harnstoff, 1% Triton X-100 oder 3% SDS bzw. vierstündige Behandlung mit 8 M Harnstoff, 2% Triton oder 5% SDS getestet. Die Spezifität der nachfolgend durchgeführten Glc-BSA-Gold-Bindung wurde durch Hemmung mit 0,3 M Saccharose geprüft.

Die Wirkung von p-Chloro-mercuri-benzoat (PCMB) (Sigma) auf die Bindung von Glc-BSA-Gold wurde durch Zusatz von 5 mM PCMB zur Gold-Inkubationslösung getestet.

Um den Einfluß zweiwertiger Ionen zu testen, wurden der Inkubationslösung 10 mM $CaCl_2$ zugesetzt. Da die Neoglykoprotein-Gold-Komplexe dann meist nicht mehr stabil waren, wurde zur Stabilisierung 0,1% BSA zugegeben.

Die Beteiligung von Proteoglykanen an der Bindung von Glc-BSA-Gold wurde durch 10minütige Vorinkubation des Neoglykoprotein-Goldsoles mit Heparin (Serva; 1000 IU/g), Chondroitinsulfat (Sigma; aus Knorpel von Wal und Hai, Grade II) oder Hyaluronsäure (Boehringer, Mannheim; aus Nabelschnur) überprüft.

Ultradünnschnitte wurden mit einem Reichert OmU3 Ultramikrotom mit einem Diamantmesser angefertigt. Sie wurden auf Kupfernetzchen aufgefangen, die mit Formvar-Pioloform befilmt waren; nach Kontrastierung mit 5% wässriger Uranylacetatlösung und Bleicitrat wurden sie in einem Zeiss EM-9 S2 untersucht.

4. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Um von der räumlichen Struktur der Spitzen der Schmeckhaare ein Bild zu gewinnen, wurden Semidünnschnitte von Maxillartastern von *Periplaneta americana* rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die ca. 1 µm dicken Schnitte wurden auf Deckglassplitter aufgeklebt und das Araldit anschließend nach der Methode von Maxwell (1977) in modifizierter Form herausgelöst. Dazu wurden 2,5 g NaOH in einer Mischung 25 ml wasserfreiem Ethanol und 25 ml Propylenoxid gerührt, bis etwa zwei Drittel der NaOH gelöst waren. Die Schnitte wurden 60 Sekunden mit dieser Lösung behandelt, anschließend mit wasserfreiem Ethanol abgespült und luftgetrocknet. Sie wurden dann in einem Balzers Sputtergerät mit Gold besputtert und in einem Hitachi 502 SEM mit einer Kathodenspannung von 10 kV untersucht. Totalpräparate wurden in OsO_4 fixiert, über die Alkoholreihe und Aceton entwässert, im Critical Point-Verfahren getrocknet, mit Gold besputtert und in einem Leitz AR-2000 Raster-Elektronenmikroskop bei 20 kV untersucht. Fotografiert wurde auf Kodak Panatomic X Filmmaterial.

5. Lichtmikroskopische Untersuchungen und Silberlatensifizierung

Es wurden Männchen und Weibchen von *Protophormia terraenovae* im Alter von fünf bis zehn Tagen verwendet. Die Labellen wurden abpräpariert und in 40fach mit Aqua bidest verdünntem Glc-BSA-Gold 10 Minuten inkubiert. Um zu verhindern, daß die Labellen wegen der langen Schmeckhaare auf der Oberfläche schwammen, war es notwendig, sie in die Inkubationslösung zu zentrifugieren. Anschließend wurde überschüssiges Goldmarkiertes Neoglykoprotein kurz abgewaschen und die Labellen mit 2,5% Glutaraldehyd in Aqua bidest mindestens eine Stunde fixiert. Vor der Silberlatensifizierung wurden die Präparate gründlich mit Aqua bidest gewaschen, um zu vermeiden, daß Halogenide in die

Entwicklerlösung gelangen. Aus dem gleichen Grund wurde auch so oft wie möglich auf die Verwendung von Puffer verzichtet.
Die Spezifität der Bindung kann auch hier durch kompetitive Hemmung mit Zuckern überprüft werden. Die Präparate wurden mit 400 µl 1 M Zuckerlösung 15 Minuten vorinkubiert, danach wurden 10 µl markiertes Goldsol zupipettiert, gut gemischt und 10 Minuten inkubiert wie im positiven Versuch.
Es wurde außerdem die Wirkung von 10 mM und 100 mM EGTA bzw. EDTA, von 3% Dextran 4 (Serva), von Pronase P (Serva, s.o.) und von PCMB (Sigma, s.o.) sowie die Hemmung der Glykoproteine untereinander getestet.
Die Silberlatensifizierung erfolgte nach der Methode von Springall *et al.* (1984) in modifizierter Form. Die Reaktionslösungen aus 11 mg Silberlactat in 1,5 ml Aqua bidest und 85 mg Hydrochinon in 8,5 ml Citratpuffer wurden unter Rotlicht hergestellt und erst unmittelbar vor dem Gebrauch gemischt. Die Dauer der Latensifizierung betrug maximal sechs Minuten, längere Latensifizierungszeiten führten zu unspezifischen Silberausfällungen. Nach der Fixierung mit 2,5% $Na_2S_2O_3$ und 0,52% $K_2S_2O_5$ wurden die Labellen mit Aqua bidest gewaschen, über die Alkoholreihe entwässert und über Xylol in Malinol eingedeckt. Die Untersuchung der Präparate erfolgte in einem Zeiss Fotomikroskop III; für die Dokumentation wurde Filmmaterial der Marke Agfapan oder Kodak Panatomic X verwendet.
Zur Auswertung wurden Haarspitzen, an denen Silberkörner vorhanden bzw. nicht vorhanden waren, ausgezählt. Die quantitative Auswertung wurde statistisch mit dem U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney (Sachs, 1978) für ungepaarte Stichproben durchgeführt.

6. Biochemische Methoden

a) Herstellung der Elektrophoresegele

Die Elektrophorese wurde in Minigelplatten vom Format 0,7 mm x 60 mm x 90 mm mit einem linearen Acrylamidgradienten von 12 bis

19% in 0,38 M Tris-HCl (pH 8,8) und 0,2% SDS (sodium dodecyl sulphate) durchgeführt. Die zur Herstellung der Trenngele verwendete Stammlösung enthielt 30% Acrylamid. Die Polymerisatioin wurde mit Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin (TEMED) gestartet, deren Endkonzentrationen im Gel betrugen 0,04% APS und 0,03% TEMED in der 12%-Komponente bzw. 0,007% APS und 0,06% TEMED in der 19%-Komponente. Damit die Gele nicht während der Polymerisation an der Oberfläche austrockneten, wurden sie während dieser Zeit mit 50% Isopropanol überschichtet. Die Trenngele wurden auf Vorrat hergestellt und bis zum Verbrauch in einer feuchten Kammer mit 10% Isopropanol gelagert.
Das Sammelgel wurde unmittelbar vor Gebrauch aufgetragen. Es enthielt 5% Acrylamid und 0,2% Bisacrylamid in 0,125 M Tris-HCl und 0,1% SDS (pH 6,8). Auch hier wurde die Polymerisation mit APS und TEMED gestartet, jedoch in beiden Fällen mit einer Endkonzentration von 0,1%. Es wurde entweder mit Teflonkämmen als Formgeber ein Sammelgel mit 11 Taschen von je 5 mm Breite gegossen, oder es wurden verschieden breite Teflonstreifen verwendet. In diesem Fall erfolgte die Proteintrennung auf breiter Front, so daß ein anschließendes Blotten der Proteine auf Nitrozellulose-Folie möglich war. Es wurden pro 5 mm Tasche 10 bis 15 µg Protein aufgetragen.

b) Herstellung der Proben

Maxillartaster von 250 *Periplaneta americana* wurden abgeschnitten und die Schnittstelle mit Dentalwachs versiegelt, damit nicht zu viele Proteine aus dem Innern des Tasters in die Probelösung gelangen konnten. Die Extraktion erfolgte zunächst vier Stunden in 8 M Harnstoff bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht in 5% SDS und 3% Mercaptoäthanol bei 8°C. Zur Festlegung der Extraktionsbedingungen wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen (s.o.) herangezogen, die zeigten, bei welchen Harnstoff- bzw. SDS-Konzentrationen und -einwirkzeiten eine Veränderung oder Extraktion der Porensubstanz zu erwarten ist (s.o.). Die Labellenränder von etwa 1.000

Fliegen wurden sukzessive präpariert, sie wurden in Aqua bidest in der Kühlzelle bei -80°C aufgehoben. Es wurde nur eine Extraktion mit 5% SDS und 3% Mercaptoäthanol vorgenommen; in der SDS-PAGE wurde aber zusätzlich auch der bei der Lagerung entstandene wässrige Extrakt aufgetrennt.
Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Biorad-Test (Biorad, München; Bio-Rad Protein Assay). Da bei dieser Methode SDS bzw. Harnstoff störte, wurden die Proteine der SDS-Extrakte mit 10% Trichloressigsäure (TCA) gefällt, der Niederschlag in der Eppendorf-Zentrifuge kurz zusammengeschleudert, in 100 µl 50 mM Tris aufgenommen und wieder gelöst. Die Harnstoffextrakte wurden über Nacht gegen Aqua bidest dialysiert und anschließend in einem Bachofer Speed Vac Rotationsverdampfer mit angeschlossener Kühlfalle eingeengt. Der trockene Rückstand wurde in 100 µl Aqua bidest gelöst. Je 10 µl der so vorbereiteten Lösungen wurden zum Biorad-Test verwendet, die Gesamtmenge an Protein je Probe errechnet und der Rest der Lösungen auf einen Proteingehalt von 10 bis 15 µg Protein pro 5 bis 10 µl (angestrebtes Probenvolumen) eingestellt.
Die so vorbereiteten Proben wurden mit einem Zehntel ihres Volumens folgender Lösung versetzt: 11% SDS, 0,011 M EDTA, 55% Mercaptoethanol in 0,11 M Tris-HCl (pH 8,0) (modifiziert nach Laemmli, 1970). Die Proben wurden im Wasserbad drei Minuten gekocht und anschließend mit einem Tropfen 0,1% Bromphenolblau in Glycerin und einigen µl Mercaptoäthanol versetzt. Das Probenvolumen betrug je nach Proteinkonzentration 5-10 µl pro 5 mm Tasche bzw. 30-50 µl für eine 30 mm Blotting-Tasche. Falls der pH-Wert der Proben durch die TCA-Fällung zu tief lag, wurde 10 N NaOH zugesetzt, bis die Farbe von Bromphenolblau von gelb nach blau umschlug.

c) Auftrennung der Proben und Färbung der Gele

Der Elektrodenpuffer enthielt 0,025 Tris-HCl (pH 8,3), 0,192 M Glycin und 0,1% SDS. Die Auftrennung erfolgte bei zwei Gelplatten nach folgendem Schema: 1 Stunde bei 200 V mit 70 mA, dann 30 Minuten bei 250 V mit 70 mA und abschließend 10 Minuten

bei 300 V mit 55 mA. Es wurde ein pulsierender Strom mit 400 Pulsen pro Sekunde verwendet. Als Standard für die Molekulargewichtsbestimmung wurde ein Gesamtextrakt des Hautmuskelschlauches von *Lumbricus terrestris* L. auf jedem Gel gefahren. Im Anschluß an die Auftrennung erfolgte entweder Transblotting auf Nitrocellulosefolie oder die Gele wurden in 17,5% Methanol, 6,25% Essigsäure, 5,6% TCA und 0,2% Coomassie Brillant Blue mindestens 2 Stunden fixiert und gefärbt. Zum Entfärben des Hintergrundes diente eine Lösung aus 30% Methanol und 5% Essigsäure, in der die Gele auch aufbewahrt wurden.
Gele, die verschiedene Extrakte und Kontrolläufe mit z.T. sehr wenig Material enthielten, wurden mit 100 ml 50% Methanol und einem Zusatz von 100 µl 37% Formalin fixiert und anschließend mit einer modifizierten Silver Stain Methode nach Oakley *et al.* (1980) gefärbt. Die Fixierungslösung wurde sehr gründlich mit Aqua bidest ausgewaschen, dann wurden die Gele 15 Minuten mit der Silberlösung inkubiert. Überschüssiges Silber wurde durch Waschen mit Aqua bidest entfernt; das Waschwasser wurde mit HCl auf seinen Gehalt an Silberionen überprüft. Die Entwicklung erfolgte in einer Schale, die nicht mit der Silberlösung in Berührung gekommen war; der Entwickler enthielt je Liter 5 ml 1% Citronensäure und 1 ml 37% Formalin. Die Gele wurden während und nach beendeter Entwicklung fotografiert, zum Abstoppen des Entwicklungsprozesses wurde 50% Methanol mit 2% Essigsäure verwendet.
Zum Fotografieren wurden die Gele von unten beleuchtet und mit einem Leitz Reprovit auf Agfapan-Film aufgenommen. Zur besseren Wiedergabe der blaugefärbten Banden wurde bei den mit Coomassie gefärbten Gelen mit einem Orangerot-Filter gearbeitet.

d) Transblotting auf Nitrozellulose-Folie

Unmittelbar im Anschluß an die SDS-PAGE können die Proteine aus den Gelen auf Nitrozellulose-Folie (Schleicher & Schüll, 0,45 µm, Nr. 401196) transferiert werden. Der Transfer-Puffer enthielt 0,025 M Tris, 0.192 M Glycin und 20% Methanol. Das Blotten erfolgte bei 4°C mit 100 V Gleichspannung und einem

Stromfluß von 140 mA für vier Stunden. Abschließend wurden die Nitrozellulose-Folien 15 Minuten in PBS gewaschen und auf Filterpapier getrocknet.

Für Übersichtspräparate wurde wegen der geringen Proteinmengen nicht die übliche Amidoschwarzfärbung, sondern die empfindlichere Aurodye-Methode nach Moeremans *et al.* (1985) angewendet. Diese Färbung beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Kopplung von Proteinen an kolloidales Gold, mit dem Unterschied, daß hier die Proteine nicht frei in Lösung, sondern an eine feste Matrix gebunden sind. Ein Teststreifen des Blots wurde 10 Minuten in PBS mit 0,3% Tween 20 und nachfolgend fünf Minuten in Aqua bidest gewaschen. Die Inkubation mit Goldsol erfolgte über Nacht in einer Lösung bestehend aus einem Teil 17 nm Goldsol und einem Teil 10 mM Citratpuffer mit 1% Tween 20 bei pH 4,0.

Um die Zuckerbindungsfähigkeit der einzelnen Banden zu ermitteln, wurden Teststreifen der Transblots mit an Gold gekoppelten Neoglykoproteinen inkubiert. Die Banden, die Zucker binden können, werden dadurch rot, mit nachfolgender Silberlatensifizierung schwarz angefärbt. Die Streifen wurden zunächst 15 Minuten in PBS eingeweicht und dann zum Abdecken unspezifischer Bindungsstellen eine Stunde bei 40°C mit einer steril filtrierten Lösung von 3% BSA (Sigma; Fraction 5) in PBS inkubiert. Für die Inkubation mit Peroxidase oder Asialofetuin wurden die Oligosaccharid-Seitenketten der BSA-Fraktion aufoxidiert. Die Oxidation erfolgte mit Natrium-Perjodat nach Glass *et al.* (1981), überschüssiges BSA wurde mit PBS abgewaschen. Die Inkubation mit Neoglykoprotein-Gold erfolgte nach der von Rohringer und Holden (1985) angegebenen Methode in modifizierter Form. 50 µl Glc-BSA-Gold wurden mit 2 ml PBS verdünnt und die Blots damit 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Teststreifen 10 Minuten in PBS gewaschen und entweder getrocknet oder direkt mit Silber latensifiziert. Dazu wurden sie zunächst gründlich in Aqua bidest gewaschen, um eventuell vorhandene Halogenide zu entfernen. Die Latensifizierung erfolgte wie bereits beschrieben

mit Silberlactat und Hydrochinon als Entwickler und sollte unter sechs Minuten dauern. Nach der Fixierung wurden die Blotstreifen mit Aqua bidest gewaschen und getrocknet. Die Spezifität der Bindung wurde durch kompetitive Hemmung mit verschiedenen Zuckern in unterschiedlichen Konzentrationen getestet, und zwar mit Maltose, Saccharose, Fructose, Glucose oder Mannose, jeweils 0,3 M, 0,5 M und 1 M. Die entsprechenden Teststreifen wurden nach Abdecken mit BSA für 30 Minuten mit 2 ml der Zuckerlösung vorinkubiert. Dann wurden 50 µl Glc-BSA-Gold zugegeben und sofort gemischt. Es ist wichtig, daß das Goldsol nicht direkt mit der Nitrozellulosefolie in Berührung kommt, da in dem Fall ein Teil des beladenen Goldes irreversibel in der Folie gefangen wird.
Zur quantitativen Auswertung der Blots wurden die Teststreifen latensifiziert und in einem LKB Ultrascan Laser-Densitometer mit angeschlossenem integrierendem Printer-Plotter HP 33907 untersucht. Zur Auswertung der Densitogramme wurden die Peakhöhen ausgemessen, da die Werte der Peakflächen häufig durch eine Drift der Grundlinie und nicht einzeln erfaßte Nebenpeaks verzerrt wurden.

7. Elektrophysiologische Untersuchungen

Die elektrophysiologischen Versuche erfolgten an der in Abb. 11a dargestellten Anlage am isolierten Maxillarpalpus. Die Ag/AgCl-Kapillarelektroden wurden mit Schaben-Ringer nach Howes und Leech (1985) gefüllt. Die differente Elektrode diente auch der Reizung der Schmeckhaare. Dazu wurde in die Spitze einer Kapillare eine kleine Menge der Reizlösung eingesaugt. Um ein Austrocknen der Reizlösungen während der Ableitung zu verhindern, wurden diese mit 0,05% Polyvinylpyrrolidon (Fluka, Buchs, Schweiz; MG 360 kD) versetzt. Die Konzentration der Glc-BSA-Lösung betrug 10 mg auf 100 µl Ringerlösung, Zucker und L-Prolin wurden in einer Konzentration von 1 M getestet. Die indifferente Elektrode wurde gleichzeitig als Halter und auch zur Aufrechterhaltung des Hämolymphdrucks im Taster benutzt.

C. Ergebnisse

1. Verhaltensexperimente

Das wichtigste Geschmacksorgan der Schaben stellen die Endglieder der Maxillartaster dar, die zahlreiche Haarsensillen tragen (Abb. 1a). Von den kleinen Schmeckhaaren, die auf der Ventralseite des Maxillartasters von *Periplaneta americana* ein fast homogenes Feld von Sinneshaaren bilden (Abb. 1a, inset), ließen sich keine elektrischen Antworten auf Zucker bzw. Neoglykoproteine oder Aminosäuren ableiten, während ein anderer Haartyp an der Palpenspitze auf Zucker und Glc-BSA ansprach (s.u.). Deshalb wurde in Verhaltenstests geprüft, ob Schaben Saccharose schmecken können, wenn die Palpenspitze verklebt oder entfernt ist. Die Antwortreaktion erfolgt schneller, wenn der Zucker nicht in kristalliner Form, sondern gelöst oder wenigstens in angefeuchtetem Zustand angeboten wird. Normalerweise erkunden Schaben die nächste Umgebung der Mundwerkzeuge, indem sie sie mit dem ventralen Sinnesfeld der Maxillartaster untersuchen. Stoßen sie dabei auf eine Flüssigkeit, so wird die Spitze eingetunkt und die Lösung anschließend mit dem ventralen Sinnesfeld überprüft.

Das einfachste Ausschaltexperiment besteht darin, die Spitze des Maxillartasters abzuschneiden und zusätzlich die Labialtaster zu entfernen. Die Schaben reagieren danach viel langsamer auf angebotene Zuckerlösungen; sie überleben diese Operation einige Wochen, auch wenn sie nur mit Zucker gefuttert werden. Der Nachteil dieser Methode ist aber, daß meist auch ein mehr oder weniger großer Teil der kurzen Schmeckhaare entfernt oder beschädigt wird.

Man kann Kontaktchemorezeptoren auch ausschalten, indem man sie mit Sekundenkleber überzieht. Dabei ist es wichtig, daß der Klebstoff mit etwas Wasser zum Aushärten versehen wird. Wachs oder Lack waren zum Verkleben der Haare nicht geeignet, da die Tiere die Schutzschicht in kurzer Zeit von den Palpen abkauten. Es wurden entweder die Haare an der Palpenspitze oder

diejenigen des ventralen Sinnesfeldes verklebt. Zusätzlich wurden in Kontrollversuchen die Antennenspitzen gekappt und das Sinnesfeld auf dem Labialtaster verklebt. Es ergaben sich jedoch keine Hinweise auf eine Beteiligung dieser Organe am Zuckergeschmackssinn der Schaben. Nicht auszuschalten sind Geschmackssinnesorgane, die sich eventuell auf der Innenseite des Mundraumes befinden. Tarsale Geschmackshaare gibt es bei Schaben nicht (Frings, 1946).

Die Versuche zeigten, daß *Periplaneta americana* sowohl mit der Palpenspitze als auch mit dem ventralen Sinnesfeld des Tasters allein nur sehr schwer in der Lage ist, zuckerhaltige Nahrungsquellen aufzufinden. Jede Störung des Maxillartasters wirkte sich äußerst negativ auf das Gesamtverhalten der Tiere aus. Statt wie üblich ständig die nähere Umgebung mit den Maxillartastern zu erforschen, liefen die Schaben häufiger mit erhobenen Tastern umher, benutzten sie kurz und versuchten dann, den störenden Klebstoff abzukauen, was ihnen manchmal auch gelang. Deshalb wurden die Schaben, die von der Saccharose fraßen, eingefangen, um zu prüfen, ob der Klebstoff noch vorhanden war. Zum Teil jedoch fraßen die Tiere nicht mehr, sondern zerkauten bei dem Versuch, den Klebstoff zu entfernen, nach und nach das Endglied des Tasters, was schließlich den Hungertod bedeutete. Da sich so große individuelle Unterschiede zeigten, schien es sinnvoll, auf eine quantitative Bearbeitung zu verzichten und diese Versuche qualitativ als Hinweis darauf zu werten, daß das ventrale Sinnesfeld an der Zuckerrezeption beteiligt ist; diese Annahme wird durch den Nachweis von nicht löslichen α-Glucosidasen aus diesem Sinnesfeld unterstützt (Wieczorek, 1978; Altner und Prillinger, 1980).

Um die Wirksamkeit von Neoglykoproteinen auf Zuckerschmeckhaare zu testen, wurden sie in Verhaltensexperimenten untersucht. Dafür hungerten *Periplaneta americana* zwei bis vier Tage, *Protophormia terraenovae* vier Stunden vor dem Versuch, wurden aber ausreichend mit Wasser versorgt.

Während die Fliegen auf Glc-BSA-haltige Lösungen nicht ansprachen, bevorzugten Schaben Glc-BSA gegenüber Gal-BSA bzw.

Peroxidase. Um ein ausreichendes Nahrungsangebot machen zu können, wurden für die Neoglykoproteinlösungen Haferflocken als Trägersubstrat verwendet. Als Kontrolle dienten Haferflocken mit Wasser. Die Konzentration der Neoglykoproteine betrug ca. 4 mg/ml. Die Schaben, die aus einem der Näpfe fraßen, wurden gezählt. Die Tiere hatten die Möglichkeit, mehrmals einen Napf aufzusuchen. Während des Versuches wurden die Positionen der Töpfe vertauscht, um Lerneffekte auszuschließen. Schaben fressen recht gern Haferflocken. Daher wurden in den ersten Minuten, wenn die Tiere noch sehr hungrig waren, alle Nahrungsangebote in gleicher Weise genutzt. Sehr bald gingen die Schaben jedoch dazu über, zunächst die Angebote zu testen und sich dann vermutlich für das "Schmackhafteste" zu entscheiden. Es wurde eine Gruppe von ca. 20 Tieren getestet. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse dieser Versuche.

Tabelle 1: Nach zwei- oder viertägiger Hungerperiode wurden Schaben Nahrungsquellen zur Auswahl angeboten, die Neoglykoproteine bzw. Peroxidase enthielten. Es wurde gezählt, wie oft die Schaben an den einzelnen Futterstellen fraßen. Zum Vergleich wurden einige Zucker in einer Konzentration von 1 M getestet. Die Versuchsdauer betrug jeweils 60 Minuten.

Ausgehungert	Glc-BSA	Gal-BSA	Perox.	Wasser
2 Tage	21	3	0	1
2 Tage	9	6	9	1
4 Tage	54	29	21	18
	Glucose	Fructose	GlcNAc	Wasser
4 Tage	33	42	25	6

Ein Vergleich zwischen reinen Lösungen von Glc-BSA und BSA zeigte, daß Schaben auf eine reine BSA-Lösung nicht reagieren. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Tiere auf die Zucker-

komponente des Neoglykoproteins und nicht auf den Proteinanteil ansprechen.
Die Schwellenwerte für die in den Experimenten verwendeten Zucker wurden an zwölf Schaben in Einzeltests ermittelt. Als Schwellenwert wurde diejenige Konzentration des Zuckers bezeichnet, bei der zehn der zwölf Tiere versuchten, die Zuckerlösung zu fressen. Die ermittelten Werte betrugen im Einzelnen:
Mannose: >2 M; Galaktose: 1 M; Glucose: 0,4 M; Fructose: 0,1 M; Maltose: 0,09 M; Saccharose: 0,03 M. Zum Vergleich sei erwähnt, daß Frings (1946) für Saccharose einen Schwellenwert von 0,026 M fand.

2. Morphologie der Schmeckhaare

a) Schmeckhaare von *Periplaneta americana*

Der Aufbau der beiden untersuchten Typen von chemosensorischen Haaren ist in Abb. 2 schematisch dargestellt. Die Haartypen unterscheiden sich hinsichtlich der Länge des Haarschaftes und im Aufbau der Porenregion voneinander. Die Haarsensillen an der Spitze des Maxillarpalpus sind etwa 70 µm lang. Von diesen Schmeckhaaren gibt es rund 170 Stück, sie enthalten vier bis neun Dendriten und haben einen terminalen Porus (Altner und Stetter, 1982) mit einem Durchmesser von etwa 0,2 µm. Von einigen dieser Sensillen ließen sich elektrophysiologisch Antworten auf Zucker ableiten (s.u.). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Altner und Stetter (1982) konnte bei diesen Haaren weder morphologisch noch elektrophysiologisch ein Mechanorezeptor nachgewiesen werden. An der Haarbasis ist der Haarschaft mit einer zylinderförmigen Struktur in der weichen Kutikula des Sinnesfeldes verankert (Abb. 3a). Erstmals konnte mit Weizenkeim-Agglutinin-Gold nachgewiesen werden, daß die elektronendichte Kutikula, die diesen Zylinder aufbaut, Chitin enthält (Abb. 3d). Der Haarschaft ist mit dem Sockel durch eine ca. 0,2 µm dicke Gelenkhaut verbunden. Außerdem gibt es im

Innern als weitere Verbindung sog. Aufhängefasern und das Sockelseptum, das aus einer feinen, netzartigen Schicht besteht (Abb. 3c). Auch in den Aufhängefasern und im Sockelseptum (s.u., Abb. 3a und 3d) konnte erstmals Chitin nachgewiesen werden. Der Haarschaft wird, wie bei allen bisher untersuchten Schmeckhaaren, durch eine - ebenfals chitinhaltige - sog. Dendritenscheide in einen inneren und einen äußeren Rezeptorlymphraum unterteilt. Das äußere Lumen des Haares enthält extrazelluläre Tubuli, die nach der Haarbildung von der trichogenen Zelle zurückgelassene Mikrotubuli sein könnten. Das innere Lumen des Haares enthält die Fortsätze der Sinneszellen (Abb. 3b). Diese distalen Abschnitte der Dendriten enthalten keine Zellorganellen außer Mikrotubuli, die vermutlich für die Stabilität dieser sehr langen Zellfortsätze verantwortlich sind. In der Porenregion vereinigen sich Dendritenscheide und Haarschaft.

Unmittelbar unterhalb dieser Halterung beginnt die erste Hüllzelle, die tormogene Zelle. Zwischen ihr und dem Sockel ist über eine Strecke von ca. 1 µm ein sehr enger Kontakt ausgebildet (Abb. 3a), der elektronendicht ist und keinen Spalt erkennen läßt (Abb. 3c). Dieser offenbar undurchlässige Abschluß dürfte für die Funktion des Sensillums wichtig sein (Keil, 1984). Charakteristisch für diese Hüllzelle sind umfangreiche Membranfalten sowie zahlreiche Mitochondrien und Mikrotubuli, von denen bis zu 50 Tubuli in Bündeln zusammengefaßt sein können. Im basalen Bereich sind Glykogenreserven vorhanden. Aufgrund dieser Merkmale kann angenommen werden, daß diese Zelle das Bestandspotential des Sensillums aufrecht erhält (s.u. sowie Thurm, 1970).

Die zweite Hüllzelle, die trichogene Zelle, schließt zusammen mit der ersten Hüllzelle den äußeren Rezeptorlymphraum nach basal ab. Sie umgibt die Dendritenscheide bis etwa zur basalen Verankerung des Haarschaftes; ihre Oberfläche trägt an der dem Rezeptorlymphraum zugewandten Seite viele Mikrovilli.

Kennzeichnend für die dritte Hüllzelle von *Periplaneta americana*, die thecogene Zelle, sind apikale Sekrettropfen mit

einem maximalen Durchmesser von ca. 1 µm. Auch bei *Schistocerca gregaria* fanden Blaney und Chapman (1969) ähnliche Sekrettropfen in der dritten Hüllzelle (basale Neurilemmazelle), die sie als Vorläufer der Porensubstanz ansprachen. Die dritte Hüllzelle umgibt mit ihrem apikalen Bereich eng das basale Ende der Dendritenscheide. Zwischen den unterschiedlichen Hüllzellen sowie in ihren Überlappungszonen sind septierte Desmosomen ausgebildet, so daß der äußere Rezeptorlymphraum von der Hämolymphe isoliert wird.

Auf dem länglichen ventralen Sensillenfeld des Maxillartasters stehen dicht gedrängt ca. 2500 kurze Haarsensillen mit abgeflachter Spitze und schlitzförmigen öffnungen (Abb. 1a und inset) (Altner und Stetter, 1982; Altner und Prillinger, 1980). Außer der Anzahl und der äußeren Morphologie sind nur wenige Einzelheiten des inneren Aufbaus bekannt. Ein Mechanorezeptor fehlt in diesen Haarsensillen (Altner und Stetter, 1982). Die Schmeckhaare haben einen etwa 15 µm langen Haarschaft, in dessen innerem Lumen die Dendriten der sechs bis zehn Sinneszellen liegen (Abb. 4b). Verzweigungen der distalen Dendritenabschnitte wurden nicht beobachtet.
Die Sinnes- und Hüllzellen der Sensillen bilden einen ca. 50 µm langen, gestreckten Komplex, der schräg in proximaler Richtung zum median gelegenen Nerv des Maxillartasters zieht. Die benachbarten Epidermiszellen passen sich dieser Laufrichtung an; sie tragen einen apikalen Mikrovillisaum. Ihr Plasma ist elektronendicht und enthält vor allem Mitochondrien, Golgizisternen, rauhes endoplasmatisches Retikulum und gespeichertes Glykogen. An den Grenzen zu benachbarten Hüllzellen sind septierte Desmosomen ausgebildet. Die Ausstattung mit Hüllzellen gleicht der der Haarsensillen an der Palpenspitze (Abb. 4a).
Das Zellplasma der ersten, äußersten Hüllzelle ist elektronenlicht, es enthält viele Mitochondrien, die zum Teil bis in die umfangreichen apikalen Membraneinfaltungen ragen. Der äußere durchgehende Plasmasaum ist meist weniger als 1 µm

breit. Im Zellplasma befinden sich einzelne Mikrotubuli und Vesikel mit elektronenlichtem Inhalt. Der basale Abschnitt enthält den Zellkern und gespeichertes Glykogen. Die Zelle überlappt über eine weite Strecke mit sich selbst, indem sie "Falz und Nut" ausbildet, die mit septierten Desmosomen und Maculae adhaerentes verbunden werden. Weil der Sensillenkomplex schräg gelagert ist, liegt die erste Hüllzelle auf einer Seite etwa 3 µm weit der Kutikula an.
Etwa 10 µm unterhalb des Haarsockels beginnt die zweite Hüllzelle; sie trägt auf der dem Rezeptorlymphraum zugewandten Seite einen Mikrovillisaum und liegt mit der anderen Seite eng der Dendritenscheide an. Zwischen erster und zweiter Hüllzelle gibt es kurze septierte Desmosomen. Das Zellplasma der zweiten ist elektronendichter als das der ersten Hüllzelle (Abb. 4a) und enthält neben Mitochondrien auffallend viele, einzeln liegende Mikrotubuli. Im basalen Bereich liegt in einer Aussackung der Zellkern.
Die dritte Hüllzelle umgibt den basalen Abschnitt der Dendritenscheide und bildet weiter basal einen Sinus mit unregelmäßiger Oberfläche, an dessen proximalem Ende die ciliären Abschnitte der Dendriten (Abb. 4c). Besonders auffällig an dieser Zelle sind die großen elektronendichten Sekrettropfen im apikalen Bereich. Die ciliären und die proximalen Abschnitte der Dendriten werden von der dritten Hüllzelle eng umschlossen. Die Somata der Sinneszellen liegen in Strängen angeordnet subepidermal im zentralen Hämolymphraum (Altner und Stetter, 1982). Sie werden von einer sog. Gliazelle umhüllt, die die einzelnen Somata nicht vollständig trennt (Abb. 4d).

Während die Geschmackssensillen der Palpenspitze einen einfachen Porus besitzen, ist bei den Schmeckhaaren des großen Sensillenfeldes eine komplizierte, kutikulare Hilfstruktur um den Porus ausgebildet (Abb. 5a), deren räumliche Anordnung mit Hilfe von Semidünnschnittserien im Rasterelektronenmikroskop untersucht wurde. Der Haarschaft ist etwa 15 µm lang und endet

mit einer knopfartigen Verdickung, die an einer Seite abgeflacht ist. Diese Fläche hat einen zentralen Längsschlitz, von dem aus zu beiden Seiten etwa ein Dutzend Nebenarme abgehen, die den Endknopf bis herunter zu der halsartigen Einschnürung spalten. Dieses Schlitzsystem führt in einen Vorhof, der meist ganz mit der sog. Porensubstanz gefüllt ist. Zumindest einige der Dendriten ragen in diesen Raum hinein, einige enden vermutlich unterhalb des Vorhofes. Die Verbindung zwischen dem die Dendriten enthaltenden Lumen und dem Vorhof wird von erkerartigen Vorsprüngen der Haarwand, die gemeinsam eine linke und recht Lippe bilden, verengt. Etwas unterhalb der halsartigen Einschnürung verschmelzen Dendritenscheide und äußere Haarwand, so daß nur das innere Haarlumen direkt mit der Außenwelt in Kontakt tritt. Das äußere Haarlumen setzt sich nach basal in den äußeren Rezeptorlymphraum fort; es enthält im Haarschaft oft extrazelluläre Tubuli (s.o.), die von der Dendritenscheide zur Haarwand ziehen, wo sie möglicherweise bis zur Außenseite des Haares reichen. Zahlreicher als bei *Periplaneta americana* sind die Tubuli bei *Protophormia terraenovae* (s.u.) und besonders dicht und zahlreich liegen sie in Schmeckhaaren von *Locusta migratoria* vor. Dort reichen sie nach eigenen Untersuchungen durch die Kutikula des Haarschaftes hindurch und stellen so vermutlich eine Verbindung zwischen dem äußeren Rezeptorlymphraum und der Außenwelt her. Eine Übersicht über den Aufbau des Haarschaftes der kleinen Sensillen von *Periplaneta americana* gibt Abbildung 5a.

b) Labellare Schmeckhaare von *Protophormia terraenovae*

Die Struktur der labellaren Schmeckhaare von Fliegen wurde bereits von verschiedenen Autoren untersucht (Dethier, 1955; Larsen, 1962; Peters, 1965; Hansen und Heumann, 1971; Stürckow *et al.*, 1973; Felt und Vande Berg, 1976). Die Porenregion wurde sowohl von Stürckow *et al.* (1973) als auch von van der Wolk *et al.* (1984) beschrieben. Hier sollen lediglich einige neue Aspekte, die sich bei der Untersuchung gefriersubstituierten

Materials ergaben, vorgestellt werden. Ein Querschnitt durch den Haarschaft mit den innen liegenden Dendriten ist in Abb. 6a dargestellt. Der Porus der labellaren Schmeckhaare ist eine einfache, subterminal gelegene öffnung, die bei *Protophormia terraenovae* einen Durchmesser von ca. 0,2 µm hat. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von Tominaga (1975) an labellaren Schmeckhaaren von *Boettcherisca peregrina* zeigten einen Porus von nur 0,08 µm x 0,05 µm Ausdehnung. Der Porus kann unter bestimmten Bedingungen geschlossen werden (van der Wolk *et al.*, 1984). Am Schließmechanismus könnten die im äußeren Haarlumen in unmittelbarer Nähe des Porus liegenden extrazellulären Tubuli beteiligt sein, die in der Kutikula des Haarschafts verankert scheinen und möglicherweise bis zur Oberfläche des Haares reichen. Ähnlich wie bei den kurzen Schmeckhaaren von *Periplaneta americana* geht der Porus auch bei *Protophormia terraenovae* zunächst in einen Vorhof über, in den jedoch kein Dendrit hineinreicht. Der Vorhof wird gegen das innere Haarlumen durch eine Reuse aus Kutikulastäbchen von jeweils etwa 20 nm Durchmesser abgeschlossen, die vermutlich mit der sog. Cupola (Stürckow *et al.*, 1973; de Kramer und van der Molen, 1984) identisch ist (Abb. 6b). Zwischen diesen Stäbchen sowie im Vorhof findet man eine Porensubstanz, die weniger fein verteilt und elektronendichter als bei *Periplaneta americana* erscheint. Ein Pfropf, bestehend aus Porensubstanz, wie ihn de Kramer und van der Molen (1984) bei der Entwicklung der Haare beobachteten, war nicht vorhanden. Die Dendriten enden unterhalb der Cupola (de Kramer und van der Molen, 1984), der Abstand zum Porus ist nicht genau bekannt, Hansen und Heumann (1971) geben für tarsale Schmeckhaare einen Abstand von 0,5 µm unterhalb des Porus an. Da der Vorhof 0,4 µm tief ist, könnte ein ähnlicher Abstand auch für die labellaren Schmeckhaare in Betracht kommen. Der Porusbereich ist in Abb. 5b schematisch dargestellt.

3. Elektronenmikroskopische Darstellung der Zuckerbindungsstelle

Verhaltensexperimente mit Schaben und Fliegen haben gezeigt, daß diese Tiere verschiedene Zucker erkennen können; die Schwellenkonzentrationen der Zucker nehmen in folgender Reihenfolge zu: Saccharose - Fructose - Maltose - Glucose - Galaktose - Mannose (s.o. und Minnich, 1931). Es werden auch Zucker in α-D-methylierter Form erkannt; die Reaktion auf ß-Glucoside ist hingegen nur schwach. Da alle genannten Zucker schnell metabolisiert werden können, hat eine Untersuchung zur Lokalisation des Bindungsortes mit markierten Einzelzuckern wenig Aussicht auf Erfolg.

In den letzten Jahren hat sich kolloidales Gold als Marker für die Elektronenmikroskopie bewährt. Man kann daran jedoch nur Substanzen mit einem Molekulargewicht von mindestens 40 bis 60 kD koppeln. Für die Lokalisation von Zuckerbindungsstellen kommen daher allenfalls Glykoproteine in Frage, die nur einen Zuckertyp in der Peripherie besitzen; Peroxidase z. B. trägt als endständigen Zucker Mannose. Bei einem aus Blutserum isolierten Protein, Fetuin, kann durch Behandlung mit Neuraminidase die terminale Neuraminsäure abgespalten und als folgender Zucker Galaktose freigelegt werden. Die Galaktosereste dieses sog. Asialofetuins liegen allerdings in einer für die Untersuchung von Geschmackssensillen ungünstigen ß-glucosidischen Bindung vor. Ungünstig ist außerdem, daß die beiden endständigen Zucker diejenigen mit der höchsten Reizschwelle in der o.g. Reihe sind; ihre Affinität zur Bindungsstelle dürfte also gering sein. Peroxidase hat zusätzlich den Nachteil, das sie in ihrer handelsüblichen Form aus zahlreichen Isoenzymen besteht, die leicht zu unspezifischen Reaktionen führen können. Außerdem ist ungewiß, wieviele Zuckerreste ein Proteinmolekül trägt. Trotzdem bieten beide Glykoproteine grundsätzlich die Möglichkeit, an kolloidales Gold gekoppelt eine Zuckerbindungsstelle elektronenoptisch sichtbar zu machen. Die Spezifität der Bindung

läßt sich durch kompetitive Hemmung mit Galaktose bzw. Mannose feststellen.
Es gibt aber auch künstliche Glykoproteine, die von Rinder-Serumalbumin (BSA) ausgehend synthetisiert werden. Dabei werden über freie Aminogruppen Penta-acetyl-cyanomethyl-thio-pyranoside in einer nukleophilen Substitutionsreaktion (Herstellerinformation und Lee *et al.*, 1976) kovalent an BSA gebunden. Nach Entfernung der Acetylgruppen verbleibt ein Pyranoserest am Albumin. Auf diese Weise lassen sich über 40 Mol Zucker pro Mol Albumin koppeln. Diese Methode eignet sich nur für Einfachzucker in der Pyranoseform. Fructose oder Saccharose kommen daher nicht als für die Herstellung von sog. Neoglykoproteinen in Frage. Aus dieser Stoffgruppe eignete sich Rinder-Serumalbumin mit Glucoseresten, im folgenden kurz als Glc-BSA bezeichnet, am besten zur Lokalisation von Zuckerbindungsstellen an Schmeckhaaren von Insekten. Für die Kopplung an kolloidales Gold wurde Glc-BSA mit ca. 30 Glucoseresten verwendet, da die elektrostatische Anlagerung an die Goldkolloide im Wesentlichen über Aminogruppen erfolgt. Außerdem wurde Gal-BSA mit fünf Galaktoseresten getestet.

Alle verwendeten Substanzen banden im Porusbereich der kleinen Schmeckhaare von *Periplaneta americana* (Abb. 7). Asialofetuin wurde erwartungsgemäß nur wenig gebunden (Abb. 7c und d). Sowohl die labellaren Schmeckhaare von *Protophormia terraenovae* als auch die Haarsensillen der Palpenspitze wurden nur mit Glc-BSA getestet, auch hier erfolgte die Bindung in der Porensubstanz. Bei *Protophormia terraenovae* wurden die Neoglykoprotein-Gold-Komplexe lediglich im Vorhof, aber niemals im Haarlumen gefunden (Abb. 6b). Die weitere Bearbeitung der labellaren Schmeckhaare erfolgte aus technischen Gründen lichtmikroskopisch (s.u.). Auch bei *Periplaneta americana* fand sich der größte Teil des beladenen Goldes im Vorhof des Porus, in der Porensubstanz wieder; im Unterschied zu den labellaren Schmeckborsten drangen einzelne Goldkörner ins innere Haarlumen ein. Gelegentlich band Glc-BSA-Gold auch an einen Dendriten. Gemäß dem allgemein angewendeten

Funktionsschema für Kontaktchemorezeptoren könnte man annehmen, daß ein einzelner Dendrit eine große Zahl von Zuckerbindungsstellen aufweist. Dafür gibt es aber keine Anhaltspunkte. Die Spezifität der Bindung von Neogklykoproteinen in der Porensubstanz konnte durch kompetitive Hemmung mit verschiedenen Zuckern nachgewiesen werden (Abb. 7b, 7d, 7f). Zur Hemmung wurden alle o.g. Zucker und außerdem N-Acetyl-Glucosamin und Glucuronsäure sowie die verschiedenen Neoglykoproteine (Abb. 7g) verwendet. Alle Substanzen zeigten eine Hemmwirkung, wobei sich auch das Aussehen der Porensubstanz änderte. Wurde diese mit Zucker gesättigt, so erschien sie homogen (Abb. 7b).

Es erwies sich jedoch als schwierig, Unterschiede im Hemmverhalten auf elektronenmikroskopischer Ebene darzustellen. Schon im positiven Versuch variierte die in der Haarspitze angetroffene Anzahl von Goldkörnern von Haar zu Haar und von Schnitt zu Schnitt. Nach kompetitiver Hemmung war die Goldmenge zwar geringer und es veränderte sich das Aussehen der Porensubstanz (s.o.). Erschwert wurde die Beurteilung aber dadurch, daß wie im positiven Versuch die Anlagerung von Neogklykoprotein-Gold-Komplexen in den einzelnen Anschnitten recht unterschiedlich ausfiel. Als weitere Möglichkeit der elektronenmikroskopischen Darstellung der Zuckerbindungsstellen wurden Ultradünnschnitte mit Neoglykoprotein-Gold-Komplexen inkubiert. Mit dieser Methode bietet man diesen eine größere Angriffsfläche für die Anheftung, während bei der Inkubation ganzer Maxillartaster die winzigen öffnungsschlitze möglicherweise ein Hindernis darstellen. Am Schnitt wurde mehr Gold gebunden als bei Inkubation des ganzen Maxillartasters; auch die kompetitive Hemmung ließ sich durchführen. Es wurde nicht nur im Bereich der Poren Glc-BSA-Gold gebunden, sondern auch an der Rezeptorlymphe, den Epidermis- und Hüllzellen und vor allem an der Endokutikula. Diese Bindungsstellen erwiesen sich in der kompetitiven Hemmung jedoch als unspezifisch. Ein Nachteil dieser Methode ist vor allem die durch die spezielle Einbettung verursachte schlechte Strukturerhaltung (s.o.), so daß auch auf diese Art eine Markierung eines Dendriten nicht möglich war.

4. Quantitative Bestimmung der Zuckerbindungsfähigkeit

a) *Periplaneta americana*

Obwohl sich bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung Unterschiede in der Hemmleistung der Zucker andeuten, benötigt man zur Absicherung des Befundes ein Verfahren, das eine möglichst große Anzahl von Haarspitzen erfaßt. Da die optische Dichte von Goldsolen anhand ihrer Absorption bei 520 nm gemessen werden kann, erschien eine photometrische Bestimmung der insgesamt gebundenen Goldmenge möglich. Dazu war es zunächst erforderlich, die Materialmenge zu ermitteln, die eingesetzt werden mußte, um meßbare Ergebnisse zu erzielen. Um die maximal gebundene Goldmenge zu bestimmen, wurden in einem beliebigen Dünnschnitt eines positiven Präparats die Goldkörner ausgezählt. In einem Schnitt von ca. 70 nm Dicke wurden 26 Goldkörner gefunden; die Gesamtmenge betrug - bei 30 Schnitten pro Haarspitze - rund 750 Goldpartikel. Bei 2500 bis 3000 Schmeckhaaren würde demnach die maximale Ausbeute etwa 2 x 10^6 gebundene Glc-BSA-Gold-Komplexe je Maxillartaster betragen. Einen Vergleichswert lieferten Messungen an K_c-Zellen von *Drosophila melanogaster*, wobei eine Zelle im Durchschnitt ca. 20.000 Lektin-Gold-Komplexe band und die Messung mit einem Ansatz von 10^5 Zellen erfolgt (Spindler-Barth, pers. Mitteilung). Es standen in diesem Fall also etwa 2 x 10^9 Goldkörner für die Messung zur Verfügung; die gemessene Absorption lag in der Größenordnung von 0,8 bis 1. Ein vergleichbarer Wert sollte zu erwarten sein, wenn man einer Messung ca. 1000 Maxillartaster zugrunde legt. Da eine so große Zahl von Tieren nicht zu beschaffen war, und außerdem Werte unter 0,1 mit dem vorhandenen Photometer exakt gemessen werden konnten, wurden für die ersten Messungen jeweils 100 Maxillartaster eingesetzt. Nach Inkubation mit Glc-BSA-Gold wurde eine Absorption von 0,092 gemessen, bei Hemmung mit 1 M Saccharose betrug die Absorption 0,029. Diese Werte lagen in dem nach der oben durchführten Berechnung erwarteten Rahmen. Als Kontrollen wurden fixierte oder extrahierte Maxillartaster mit

Glc-BSA-Gold inkubiert und die Absorption gemessen. Die Absorptionswerte, die die unspezifische Anlagerung von Glc-BSA-Gold wiedergaben, betrugen 0,017 bzw. 0,025. Für den Vergleich der verschiedenen Zucker wurden nur noch 50 Maxillartaster je Test eingesetzt, um Tiermaterial zu sparen. Außerdem wurde mit einer Zuckerkonzentration von 0,3 M gearbeitet. Das entsprach genau den Versuchsbedingungen der elektronenmikroskopischen Experimente und ließ erwarten, daß die Unterschiede in den Hemmkapazitäten der einzelnen Zucker deutlich würden. Es wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Absorptionswerte gemessen:

Tabelle 2: Bei Bindung von Glc-BSA-Gold wurde im positiven Versuch bei 520 nm eine Absorption von 0,044 gemessen. Die kompetitive Hemmung mit verschiedenen Zuckern in einer Konzentration von 0,3 M ergab folgende Absorptionswerte:

Saccharose	0,016
Maltose	0,020
Mannose	0,036
Glucose	0,022
Fructose	0,025
Galaktose	0,029

Diese Absorptionswerte sind mit geringen Abweichungen reproduzierbar; sie stimmen sehr gut mit den gemäß der Reizwirksamkeit im Verhaltenstest erwarteten Bindungsfähigkeiten überein. Da ein unspezifisches Eindringen von Glc-BSA-Gold in den Taster durch die Versiegelung der Schnittstelle verhindert wurde und außerdem die Kontrollen recht gute Werte lieferten, kann man annehmen, daß die Anlagerung bzw. Hemmung tatsächlich an den Spitzen der Schmeckhaare stattgefunden hat und die Unterschiede zwischen den einzelnen Zuckern keine Artefakte sind. Darüberhinaus konnte die Bindung von Glc-BSA-Gold bzw. die Hemmung mit 1 M Saccharose auch lichtmikroskopisch mit Hilfe der Silberlatensifizierung dargestellt werden. Die Bindung erfolgte an den Spitzen der Schmeckhaare; ein deutlicher Unterschied

zwischen den kleinen Sensillen des ventralen Feldes und den langen Sensillen der Tasterspitze konnte nicht festgestellt werden. Die Silberkörner an den kleinen Schmeckhaaren waren etwas größer und traten regelmäßiger auf. Dies hängt vermutlich mit der besonderen Porenstruktur dieses Haartyps zusammen (s.o.).

b) *Protophormia terraenovae*

Eine photometrische Analyse der Hemmeigenschaften verschiedener Zucker ist bei *Protophormia terraenovae* aus verschiedenen Gründen nicht möglich. Ein Labellum besitzt nur etwa 250 Schmeckhaare und die Versiegelung der bei der Präparation entstehenden Schnittstelle ist nicht möglich. Außerdem begünstigt die während der Präparation auftretende, unvermeidbare starke Verschmutzung der Labellen durch Speichelabgabe die unspezifische Bindung von Neoglykoprotein-Gold-Komplexen. Die Gesamtheit der labellaren Schmeckhaare, die einer quantitativen Auswertung zugrunde liegen sollte, ist nur in lichtmikroskopischen Präparaten zugänglich. Daher wurden die Glc-BSA-Gold-Komplexe durch Anlagerung von Silber vergrößert, so daß die Bindung lichtmikroskopisch erkennbar wurde. Am Porus eines Schmeckhaares entstand auf diesem Weg ein Silberkorn von etwa 1 µm Durchmesser (Abb. 6c). Falls keine Bindung erfolgte, blieb die Haarspitze leer (Abb. 6d). Da die Entstehung ausreichend großer und damit sichtbarer Silberkörner unabhängig davon erfolgte, wieviel Gold im Porus gebunden war, mußte die Auswahl der Inkubationsbedingungen so getroffen werden, daß bei Hemmversuchen die Bindung von Glc-BSA-Gold möglichst ganz unterblieb. Dies wurde durch eine Erhöhung der Zuckerkonzentration auf 1 M und eine Verringerung der Glc-BSA-Gold-Konzentration erreicht. Diese wurde so gewählt, daß die positiven Versuche noch das gleiche Auszählungsergebnis (s.u.) erzielten wie zuvor bei höherer Konzentration.
Die entstandenen Silberkörner und die leer gebliebenen Haarspitzen wurden ausgezählt und der prozentuale Anteil der positiv und der negativ reagierenden Haare bestimmt. Haarspitzen,

die aufgrund von Beugungserscheinungen oder Verschmutzungen nicht eindeutig zur positiven oder zur negativen Gruppe gezählt werden konnten, wurden nicht berücksichtigt. Die ausgezählten Werte sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Tabelle 4 gibt die Umrechnung dieser Werte auf Prozentanteile wieder, wobei die Gesamtzahl der in einem Präparat ausgezählten Haare gleich 100% gesetzt wurde. Für die statistische Auswertung wurden für jeden Hemmversuch zehn Präparate hergestellt und einzeln gezählt ($n = 10$). Die Prozentwerte wurden mit dem U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney (Sachs, 1978) für ungepaarte Stichproben geprüft. Die entsprechenden Werte sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Wie erwartet übten alle Zucker in 1 M Konzentration eine Hemmwirkung aus. Mannose hemmte signifikant schlechter als alle anderen getesteten Zucker, Galaktose hemmte schlechter als die beiden Disaccharide Maltose und Saccharose, unterschied sich aber nicht wesentlich von den anderen Monosacchariden. Ein Unterschied zwischen Pyranosen und Furanosen war nicht zu erkennen (s. Disk.).

Eine zusammenfassende Übersichtsdarstellung der Ergebnisse gibt Abb. 6e. Die Angabe von Mittelwerten und Standardabweichungen ist zulässig, wenn die Werte angenähert normalverteilt sind. Der Quotient R/s aus Spannweite (engl.: range) R und Standardabweichung s gibt an, ob eine angenäherte Normalverteilung vorliegt (Sachs, 1978). Dies trifft für alle Werte zu (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha > 10\%$), lediglich die Hemmung mit Saccharose bildet eine Ausnahme; hier wurde statt des Mittelwertes der Median angegeben (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 3: Ergebnisse der Auszählung der Silberkörner an den Spitzen der labellaren Schmeckhaare von *Protophormia terraenovae* nach Inkubation mit Glc-BSA-Gold bzw. mit Glc-BSA-Gold und unterschiedlichen Hemmzuckern.

Glc-BSA		1 M Sac		1 M Fru		1 M Glc	
+	–	+	–	+	–	+	–
55	4	9	36	37	11	15	40
24	3	9	15	18	14	9	14
21	4	23	34	31	29	11	34
24	3	11	17	15	26	31	27
20	6	12	42	25	42	26	15
37	13	10	14	21	17	20	34
30	10	12	35	12	48	9	18
12	6	17	29	25	26	27	33
--	--	16	25	4	36	16	37
--	--	10	30	14	27	5	17

1 M Mal		1 M Gal		1 M Man		Kontrolle	
+	–	+	–	+	–	+	–
11	20	14	28	52	19	4	32
10	14	28	39	14	5	3	38
38	58	13	21	14	19	2	15
20	39	22	15	27	10	4	51
18	30	15	24	30	16	2	39
16	38	25	27	16	21	7	59
15	20	12	29	31	12	2	26
4	22	17	19	31	17	7	31
17	20	17	24	5	25	--	--
11	29	20	23	24	22	--	--

Tabelle 4: Ergebnisse der Auszählung umgerechnet in Prozentanteile, die Gesamtzahl der ausgezählten Haare entspricht 100%.

Glc-BSA		1 M Saccharose		1 M Fructose		1 M Glucose	
+	-	+	-	+	-	+	-
93,2	6,8	20,0	80,0	77,1	22,9	27,3	72,7
88,9	11,1	37,5	62,5	56,2	43,8	39,1	60,9
84,0	16,0	40,5	59,5	51,7	48,3	24,4	75,6
88,9	11,1	39,3	60,7	36,6	63,4	53,4	46,6
76,3	23,7	22,2	77,8	37,3	62,4	63,4	36,6
74,0	26,0	41,6	58,3	55,3	44,7	37,0	63,0
75,0	25,0	25,5	74,5	20,0	80,0	33,3	66,7
66,7	33,3	37,0	63,0	49,0	51,0	45,0	55,0
--	--	39,0	61,0	10,0	90,0	30,2	69,8
--	--	25,0	75,0	34,8	65,2	22,7	77,3

1 M Maltose		1 M Galaktose		1 M Mannose		Kontrolle	
+	-	+	-	+	-	+	-
35,5	64,5	33,3	66,7	73,2	36,8	11,1	88,9
41,7	58,3	41,8	58,2	73,7	36,3	7,3	92,7
39,6	60,4	38,2	61,8	42,4	57,6	11,8	88,2
33,9	66,1	59,5	40,5	73,0	37,0	7,1	92,9
37,5	62,5	38,5	61,5	65,2	34,8	4,9	95,1
29,6	70,4	48,1	51,9	43,2	56,8	10,6	89,4
42,9	57,1	29,3	70,7	72,1	27,9	7,1	92,9
15,4	84,6	47,2	52,8	64,6	35,4	18,4	81,6
45,9	54,1	41,5	58,5	16,7	83,3	--	--
27,5	62,5	46,5	53,5	52,2	47,8	--	--

Tabelle 5: Übersicht über signifikante Unterschiede in der Hemmleistung der getesteten Zucker, die mit dem U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney ermittelt wurden. Die Zucker wurden paarweise verglichen, wenn zwischen den beiden ein signifikanter Unterschied in der Hemmwirkung besteht, so ist dies in der Tabelle mit einem * gekennzeichnet.

U_{krit} beträgt für Stichproben mit dem Umfang m,n = 10 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,20$ (zweiseitig) 32, für $\alpha = 0,10$ (zweiseitig) 27.

Alle Zucker übten eine hemmende Wirkung auf die Bindung von Glc-BSA-Gold aus:

Sac, Glc, Mal, Gal: $R_1=46$, $U_1=10$, $R_2=135$, $U_2=60$

Man, Fru: $R_1=50$, $U_1=66$. $R_2=131$, $U_2= 4$

Vergl. Zucker 1 / 2	R_1	R_2	U_1	U_2	Sign.
Sac/Fru	119	91	36	64	
Sac/Glc	113	97	42	58	
Sac/Mal	115	95	40	60	
Sac/Gal	135	76	20	80	*
Sac/Man	145	65	10	90	*
Fru/Glc	95	115	60	40	
Fru/Mal	90	120	65	35	
Fru/Gal	103	107	52	48	
Fru/Man	127	83	28	72	*
Glc/Mal	106	104	49	51	
Glc/Gal	122	88	33	67	
Glc/Man	137	73	18	82	*
Mal/Gal	127	83	28	72	*
Mal/Man	152	57	3	97	*
Gal/Man	136	64	19	91	*

Tabelle 6: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen ausgehend vom prozentualen Anteil positiv markierter Haare. Die kritischen Werte für R/s sind der Fachliteratur zu entnehmen (Sachs, 1978, S. 254).

Versuch	Mittelwert/%	Standardabw.	R/s
positiv	80,9	9.21	2,88
H Fru	43.7	19,34	3,46
H Glc	37,6	13,12	3,10
H Gal	42,8	8,53	3,54
H Mal	35,0	8,97	3,40
H Man	57,7	18,85	3,02
	Median/%		
H Sac	37,0	-	2,55

Der Einfluß zweiwertiger Ionen auf die Bindung ließ sich nicht testen, da im Porus befindliche EGTA- oder EDTA-Komplexe offenbar als Kristallisationskeime bei der Silberlatensifizierung dienen können, bzw. bei Zusatz von Ca^{2+} das Goldsol ausfiel. Mit Pronase P behandelte Präparate ließen sich wegen zahlreicher, unspezifischer Silberniederschläge nicht auswerten. Die Bindung von Glc-BSA-Gold ließ sich außerdem mit Asialofetuin oder Peroxidase hemmen; Dextran 4 hatte eine schwache Hemmwirkung. Auch mit Asialofetuin- und Peroxidase-Gold ließ sich eine Bindung an den Haarspitzen nachweisen, die aber nicht so deutlich ausfiel wie die Bindung von Glc-BSA-Gold. Bei der Hemmung zeigte sich, daß nicht die Zucker Galaktose bzw. Mannose am besten hemmten, sondern Saccharose und Glucose, zu denen die Bindungsstelle demnach wohl eine stärkere Affinität hat. Ein deutlicher, hemmender Einfluß von p-Chloro-mercuri-benzoat ließ sich nicht feststellen (s.Disk.).

5. Biochemische Eigenschaften der Porensubstanz

a) Allgemeines

Nachdem sich in den elektronenmikroskopischen Präparaten die Porensubstanz als Ort der spezifischen Bindung von Zuckern erwiesen hatte und die Hemmwirkung verschiedener Zucker Parallelen zu ihrer Effektivität im Verhaltensexperiment gezeigt hatte, sollten ihre biochemischen Eigenschaften genauer untersucht werden. Mehrere Autoren (übersicht bei Pietra und Angioy, 1982) konnten in der Porensubstanz von Schmeckhaaren Proteoglykane nachweisen. Die Porensubstanz von *Periplaneta americana* reagierte in der PAS-Reaktion positiv (Abb. 8h), woraus man schließen kann, daß Kohlehydratanteile vorhanden sind. Geruchsrezeptoren auf den Antennen von *Blattella germanica* und tarsale Geschmacksrezeptoren von *Boettcherisca peregrina* konnten mit p-Chloro-mercuri-benzoat blockiert werden (Koyama und Kurihara, 1971). Die Bindung von Glc-BSA-Gold an die Porensubstanz der Schmeckhaare wurde von 5 mM PCMB nicht nachweisbar gehemmt (Abb. 8d).
Nach Zusatz von 10 mM Ca^{2+} scheint weniger Glc-BSA-Gold gebunden zu werden (Abb. 7h); eine genauere Untersuchung war jedoch nicht möglich. Nur in einem Fall blieb das Goldsol in Anwesenheit von Calziumionen stabil, sonst kam es stets zu einer Entkoppelung des Neoglykoprotein-Gold-Komplexes. Eine Stabilisierung des Goldsoles ist durch Zugabe von 0,1% BSA möglich; 0,1% BSA allein übte keine hemmende Wirkung aus, aber Wechselwirkungen bei Anwesenheit von Calzium sind nicht mit Sicherheit auszuschließen.

b) Wirkung verschiedener Enzyme

Um zu testen, ob Proteoglykane an der spezifischen Bindung von Zuckern beteiligt sind, wurden Maxillartaster mit verschiedenen Enzymen behandelt. Chondroitinase ABC hatte keine erkennbaren Auswirkungen auf die Porensubstanz und ihre Bindungsfähigkeit in Bezug auf Glc-BSA-Gold (Abb. 8a). Nach Behandlung mit

Hyaluronidase wirkte die Substanz elektronenlichter, es wurde aber nach wie vor Glc-BSA-Gold im Porus gebunden (Abb. 8c); die Goldkörner lagen scheinbar frei und berührten die verbliebenene elektronendichtere Substanz nicht. Versuche, umgekehrt vorzugehen, d.h., Glc-BSA-Gold mit verschiedenen Proteoglykanen abzudecken und so die Bindung zu verhindern, ergaben, daß weder eine Vorbehandlung mit Hyaluronsäure noch mit Chondroitinsulfat oder Heparin die Glc-BSA-Gold-Komplexe von der Anlagerung an die Porensubstanz abhält. Pronase P zerstörte einen großen Teil der Porensubstanz und damit auch der Bindungseigenschaften (Abb. 8b). Außerdem wurden auch die Sinneszellen stark geschädigt. Kontrollpräparate, die mit hitzeinaktivierter Pronase inkubiert wurden, zeigten eine wesentlich bessere Strukturerhaltung. Auch Glc-BSA-Gold wurde in diesen Präparaten gebunden; die Bindung war aber schwächer als in Kontrollen, die nur mit PBS behandelt wurden.
Diese Befunde deuten darauf hin, daß die spezifische Bindung im Porus auf ein Protein zurückzuführen ist, das zusammen mit Hyaluronsäure-ähnlichen Proteoglykanen die Porensubstanz darstellt.

b) Wirkung verschiedener Detergentien

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen einiger Extraktionsmethoden auf die Porensubstanz untersucht. Dabei erwies sich die Substanz als überraschend unlöslich in 8 M Harnstoff, 3% SDS und 1% Triton X-100 bei zweistündiger Inkubation. Deutliche Unterschiede ließen sich erst nach vierstündiger Behandlung mit höher konzentrierten Detergentien feststellen. Inkubation mit 2% Triton X-100 bewirkte lediglich eine Schädigung der Dendriten, jedoch keine Extraktion der Porensubstanz (Abb. 8e). Nach vierstündiger Einwirkung von 8 M Harnstoff hatten sich die Bindungseigenschaften im Porus deutlich verändert: Es wurde wesentlich mehr Glc-BSA-Gold gebunden als zuvor (Abb. 8f). Diese

Bindung war ebenfalls spezifisch, was auf eine Demaskierung von Bindungsstellen schließen läßt. Die Behandlung mit 5% SDS führte zu einer Entleerung des inneren Haarlumens einschließlich des Porenvorhofes (Abb. 8g). Glc-BSA-Gold wurde nur noch vereinzelt im Porenbereich gebunden, die Bindung erfolgte stattdessen am extrahierten Material. Die elektronenmikroskopischen Befunde dienten als Grundlage für die Gel-Elektrophoresen bzw. Transblot-Versuche. Diese sollten klären, ob die Auftrennung von Extrakten aus Maxillartastern eine oder mehrere Banden liefert, die Zucker binden können. ob diese organspezifisch sind und ob sich die Parallelen zum Verhaltensexperiment aufgrund der höheren Moleküldichte im Transblot noch überzeugender darstellen lassen.

6. Gel-Elektrophorese und Transfer auf Nitrozellulose-Folie

Die Extraktion mit 8 M Harnstoff setzte einige höhermolekulare Komponenten frei, von denen die kleinste ein Molekulargewicht von ca. 60 kD hatte. Keine der Banden konnte am Nitrozellulose-Transblot Glc-BSA-Gold binden. Die Extraktion mit 5% SDS löste etwa 4 mg Protein aus 250 Maxillartastern. Da der zur Proteinbestimmung verwendete Biorad-Test durch die Anwesenheit von Spuren von SDS gestört worden sein könnte, ist es möglich, daß der tatsächliche Proteingehalt der Lösung etwas niedriger als oben angegeben war. Der SDS-Extrakt ließ sich mit einem SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (SDS-PAGE) in rund 20 Fraktionen auftrennen. Die auffälligsten Banden entsprechen Proteinen mit apparenten Molekulargewichten von ca. 100 kD, 42 bis 45 kD und 20 kD. Eine relativ breite Bande mit einem Molekulargewicht von 55 kD könnte Tubulin enthalten. Die Molekulargewichte lassen sich mit der SDS-PAGE nur annähernd bestimmen, da bei Glykoproteinen die Zuckerreste die Laufstrecke im Gel unterschiedlich beeinflussen können.

Die Inkubation des auf Nitrozellulose übertragenen Materials mit Glc-BSA-Gold zeigte, daß es fünf Banden mit Zuckerbindungs-

fähigkeit gibt; ihre apparenten Molekulargewichte wurden anhand einer Eichkurve mit 100 kD, 45 kD, 40 kD, 32 kD und 20 kD bestimmt. Die Banden 3 und 5 waren sofort zu erkennen, die Banden 1, 2 und 4 wurden erst nach Silberlatensifizierung sichtbar. Die Banden 1 und 4 waren so schwach, daß sie weder photographisch noch densitometrisch einwandfrei dargestellt werden konnten; sie wurden bei der weiteren Untersuchung nicht berücksichtigt. Die Bindung von Peroxidase- und Asialofetuin-Gold ergab ein ähnliches Bandenmuster; sie fiel mit Asialofetuin schwächer aus als bei Peroxidase und war bei beiden Glykoproteinen geringer als bei Glc-BSA-Gold. Im Unterschied zu Glc-BSA reagierten mit Peroxidase und Asialofetuin auch einige Banden mit apparenten Molekulargewichten von über 100 kD deutlich. Zusatz von 5 mM PCMB zur Inkubationslösung zeigte bei keiner Bande eine hemmende Wirkung. Die Extraktion mit 5% SDS löste außer der Porensubstanz auch Bestandteile der Sinneszellen (s.o.) und wahrscheinlich auch der Epidermiszellen. Um die Organspezifität der Bandenmuster zu klären, wurden als Kontrollen Extrakte der Rückenepidermis, der Antennen und Cerci sowie des Oberschlundganglions untersucht. In Epidermis, Antennen und Cerci gab es zwei Proteine, die am Transblot Glc-BSA-Gold banden, sie traten in einer Doppelbande auf und hatten apparente Molekulargewichte von 30 und 32 kD. Die Bindung war allerdings nicht oder nur wenig spezifisch; Saccharose übte keine reproduzierbare Hemmwirkung aus. Die Möglichkeit einer quantitativen Auswertung ist dadurch gegeben, daß gebundenes Goldsol auch aus Nitrozellulose-Folie mit Non-Idet und NaOH extrahiert werden kann (Abb. 13 a). Die photometrische Bestimmung der im Blot gebundenen Goldmengen ergab für den positiven und den Hemmversuch identische Werte; es wurde eine Absorption von 0,013 gemessen. Im Gehirn-Extrakt gab es zwei Fraktionen, an denen Glc-BSA-Gold gebunden wurde; ihre apparenten Molekulargewichte lagen bei ca. 30 kD und 20 kD. Auch hier waren die Ergebnisse der Hemmversuche widersprüchlich.

Der Vergleich mit anderen Organen zeigte demnach, daß in den Maxillartastern von *Periplaneta americana* Proteine auftreten, die Zucker spezifisch binden können, und daß mindestens zwei von

diesen, mit apparenten Molekulargewichten von 40 bzw. 45 kD, organspezifisch sind. Um die Zuckerbindungsfähigkeit der verschiedenen Banden genauer zu bestimmen, wurde die kompetitive Hemmung für die Bindung von Glc-BSA-Gold mit verschiedenen Zuckern in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Anschließend wurde bestimmt, wieviel Glc-BSA-Gold bei den einzelnen Hemmversuchen noch gebunden wurde. Da die gebundenen Goldmengen zu klein waren, um sie mit dem Photometer in ausreichender Genauigkeit zu bestimmen, wurden die Versuche mit einem Laser-Densitometer ausgewertet. Da mit diesem Gerät bei der für die Bestimmung von Goldsolen optimalen Wellenlänge von 520 nm nicht gemessen werden konnte, wurde die Silberlatensifizierung angewendet. Vorversuche zeigten, daß bei kleinen Goldmengen, die den im Blot vorliegenden vergleichbar sein dürften, die Anlagerung von Silber proportional zur vorgegebenen Goldmenge wächst (Abb. 13b). Damit war sichergestellt, daß die gemessene Silberdichte als Maß für die ursprünglich vorhandene Goldmenge dienen konnte. Die beiden Banden mit apparenten Molekulargewichten von 30 bzw. 100 kD waren zu schwach, um die kompetitive Hemmung mit Zuckern mit dem Laser-Densitometer darzustellen. Da sich zudem hinsichtlich des Molekulargewichtes überschneidungen mit den Kontrollen ergaben (s.o.), wurden diese Proteine bei den weiteren Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt. Bei den übrigen Banden bestand die Möglichkeit, ihre Dichte mit dem Laser-Densitometer zu bestimmen. Als Maß für die Dichte der Banden wurde die aus dem Densitogramm bestimmte Peakhöhe gewählt, weil die Werte für die Peakflächen durch nicht gesondert berechnete Nebenpeaks sowie häufig durch eine Drift der Grundlinie verzerrt wurden. Da die Peaks meist ähnliche Breiten hatten, sollte ein Vergleich der Peakhöhen in diesem Fall mit kleineren Fehlern behaftet sein als der Vergleich der Flächen.
Der Peak der Bande bei 40 kD wurde außer für Fructose durch Extrapolation der Absorptionskurve ermittelt. Die Höhe der Peaks läßt sich außerdem rechnerisch aus den Daten des Integrators ermitteln, beide Werte stimmen gut überein. In Abb. 9d ist ein mit 0,3 M Fructose behandelter Blotstreifen und das zugehörige

Densitogramm dargestellt; die Abbildung 9e zeigt den Parallelversuch einer Hemmung mit 0,3 M Mannose.
Die nachstehenden Tabellen geben die Höhen der erfaßbaren Peaks in cm für die getesteten Zuckerkonzentrationen von 0,3 M, 0,5 M und 1 M wieder. Das Ergebnis des positiven Versuchs ließ sich wegen des bei Positiv-Inkubationen üblichen hohen Hintergrundes nicht zum Vergleich heranziehen. Mit der Abkürzung "n.m." wurden nicht mehr meßbare Peaks gekennzeichnet, Werte in Klammern sind aus Densitogrammen ohne klar erkennbare Grundlinie ermittelt.

Tabelle 7: Peakhöhen in cm bei Hemmung mit 0,3 M Zucker; vgl. Abb. 10a

Molekulargewicht/D	Saccharose	Maltose	Fructose	Glucose	Mannose
20.000	2,9	3,5	3,0	(3,6)	(4,2)
40.000	7,0	6,3	4,9	7,3	7,5
45.000	1,2	1,2	1,0	1,6	2,7

An allen drei Banden hatten Fructose und Saccharose die stärkste Hemmwirkung, gefolgt von Maltose und Glucose, die sich in ihrer Wirkung kaum unterschieden. Mannose hemmte am schlechtesten.

Tabelle 8: Peakhöhen in cm bei Hemmmung mit 0,5 M Zucker; vgl. Abb. 10b

Molekulargewicht/D	Saccharose	Maltose	Fructose	Glucose	Mannose
20.000	(4,5)	(1,6)	1,3	3,2	(1,5)
40.000	3,0	(7,0)	2,0	7,2	5,0
45.000	n.m.	0,7	0,5	0,9	1,0

Tabelle 9: Peakhöhen in cm bei Hemmung mit 1 M Zucker; vgl. Abb. 10c

Molekulargewicht/D	Saccharose	Maltose	Fructose	Glucose	Mannose
20.000	0,8	1,0	(1,2)	3,0	3,5
40.000	5,3	1,5	(2,0)	8,0	6,5
45.000	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	0,6

Eine zusammenfassende graphische Darstellung der Ergebnisse gibt Abb. 10. Die unterschiedliche Wirksamkeit der verschiedenen Zucker ließ sich auch bei höheren Zuckerkonzentrationen mit der Laser-Densitometrie zeigen, jedoch waren die Peaks im Allgemeinen kleiner und die Unterschiede wurden deshalb nicht so deutlich. Eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Verhaltensexperimente zeigte die Bande mit dem Molekulargewicht 45 kD. Auch die Hemmbarkeit der 20 kD-Bande zeigte eine entsprechende Tendenz; allerdings kommt ein zuckerbindendes Protein mit dem gleichen apparenten Molekulargewicht auch im Oberschlundganglion vor, wenngleich bei diesem die Bindung von Glc-BSA-Gold nicht spezifisch zu sein scheint. Stark schwankende Werte lieferte die 40 kD-Bande, die demnach nicht die Zuckerbindungseigenschaften aufwies, die die Porensubstanz aufgrund der übrigen Versuche kennzeichneten. Die anderen Banden könnten zelluläre, zuckerbindende Proteine und die Porensubstanz oder auch nur zwei ihrer Komponenten darstellen. Genauere morphologische Lokalisation der entsprechenden Proteine wäre über die Herstellung von Antikörpern möglich, die aber wegen der erforderlichen Reinigungsschritte eine kaum beschaffbare Menge an Tiermaterial benötigen würde.

Parallelversuche mit Schmeckhaaren von *Protophormia terraenovae* scheiterten aus verschiedenen Gründen. Labellenränder von ca. 1000 Fliegen (ca. 250.000 Haare) ergaben eine Proteinausbeute von etwa 0,019 mg beim wässrigen und 0,053 mg beim SDS-Extrakt in je 50 µl Probelösung (s.u.). Die Labellenränder wurden in mehreren Chargen präpariert und bei -80°C in Aqua bidest aufgehoben. Da beim Auftauen bereits eine Extraktion erfolgt sein könnte, wurde außer dem SDS-Extrakt auch das Aufbewahrungswasser elektrophoretisch untersucht. Als Kontrollen dienten SDS-Extrakte von Epidermis, Gehirn und Tarsen. Die in der SDS-PAGE gefundenen Bandenmuster von Epidermis und Labellenrändern waren identisch; am Transblot konnte keine Bande ermittelt werden, die spezifisch Glc-BSA-Gold binden konnte. Der wässrige Extrakt enthielt einige

Proteine, insgesamt war die Proteinmenge aber zu gering, um eine sichere Aussage zu erlauben. Aus den Tarsen ließ sich nur sehr wenig Protein lösen, das Bandenmuster zeigte gewisse Ähnlichkeiten zu dem des wässrigen Labellenextraktes.

7. Elektrophysiologische Experimente

Nach den Ergebnissen von Hara (1983) ist es fraglich, ob eine Substanz mit hohem Molekulargewicht die Zuckerbindungsstelle nur blockiert oder ob eine echte Bindung mit anschließender physiologischer Antwort erfolgt. Bereits die Verhaltensexperimente zeigten eine positive Reaktion der Schaben auf Glc-BSA, nicht aber auf BSA. Trotzdem könnte die Erkennung von Glc-BSA an anderer Stelle erfolgen als die von Glucose.
Als Sonde für zuckersensitive Sinneszellen wurde 1 M Saccharose verwendet, da dieser Zucker im Verhaltensexperiment die geringste Schwellenkonzentration hatte (s.o.). Von den langen Schmeckhaaren an der Spitze des Maxillartasters antworteten einige auf Zucker, andere hingegen reagierten auf Salzlösungen. Keines der untersuchten Haare antwortete auf die Aminosäure Prolin, die bei Verhaltensexperimenten jedoch eine positive Reaktion hervorruft (Sugarman und Jakinovich Jr., 1986).
Die Ableitpunkte und ein Ersatzschaltbild eines Kontaktchemorezeptors (verändert nach Thurm, 1970, und van Drongelen, 1979) sind in Abb. 11a dargestellt. Nach Kontaktaufnahme mit der Reizelektrode wurde zunächst ein positiver Potentialsprung gemessen, der auf die transepitheliale Potentialdifferenz (Thurm, 1970) zurückzuführen ist. In den ersten 100 ms nach Applikation des Reizes kommt es zu einer negativen Potentialentwicklung, die das Rezeptorpotential widerspiegelt. Die negative Polarität hängt mit den unterschiedlichen Potentialen der verschiedenen extrazellulären Kompartimente und den sich daraus ergebenden Ableitbedingungen zusammen.
Nach einer Latenzzeit von ca. 20 ms antworteten die zuckersensitiven Sinneszellen mit einer Salve von

Aktionspotentialen, die zwischen einer halben und einer Sekunde dauerte (Abb. 12a, b und c); es handelt sich demnach um Sinneszellen vom phasischen Typ. Die Spikeraten-Entwicklung in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abb. 11b für 1 M Saccharose, 1 M Glucose und Glc-BSA dargestellt. Die Konzentration der verwendeten Glc-BSA-Lösung entsprach etwa einer 0,7 M Zuckerlösung. Die Spikeraten betrugen anfangs bei Glc-BSA und Saccharose etwa 80/s, bei Glucose 70/s. In Sensillen, die auf Zucker reagierten, konnte keine Salzantwort registriert werden (Abb. 12d); keines der untersuchten Haare reagierte auf die Berührung mit der Elektrode. Dies spricht dafür, daß ein Mechanorezeptor in den langen Schmeckhaaren fehlt. Von den kurzen Schmeckhaaren des ventralen Feldes ließ sich lediglich die transepitheliale Potentialdifferenz ableiten, Spikes wurden bei keiner der angebotenen Reizlösungen registriert. Möglicherweise werden diese Sinneszellen geschädigt, wenn am isolierten Maxillartaster gearbeitet wird. Eventuell benötigen sie Steuerimpulse aus dem Zentralnervensystem, um ihre Funktionen auszuüben.

D. Diskussion

1. Besonderheiten der Schmeckhaare von Insekten

Im Gegensatz zu Riechhaaren gibt es bei Schmeckhaaren kaum Untersuchungen, die gleichermaßen Physiologie und Morphologie aufklären. Elektrophysiologisch sind die Schmeckhaare an den Labellen von Schmeißfliegen bisher am besten untersucht (Morita, 1972). Deren Morphologie wurde zwar von verschiedenen Autoren (Dethier, 1955; Larsen, 1962; Peters, 1965; Stürckow *et al.*, 1973; Felt und Vande Berg, 1976) untersucht, jedoch bleibt die Qualität der Fixierung weit hinter den bei Riechhaaren erzielten Ergebnissen (Steinbrecht, 1980) zurück. Es ist schwierig, den Aufbau der Haarspitze elektronenmikroskopisch zu untersuchen, da die Haare sehr lang und apikal gebogen sind. Daher kann die Zuckerbindungsstelle elektronenmikroskopisch nur unzureichend untersucht werden. Als Versuchsobjekt wurden deshalb die für elektronenmikroskopische Untersuchungen wesentlich günstigeren, dicht stehenden Geschmackssensillen auf den Maxillartastern von Schaben gewählt. Diese Sensillen sind leider elektrophysiologisch bislang nicht untersucht. Um dennoch physiologische Daten zum Vergleich heranziehen zu können, wurden die Untersuchungen soweit möglich parallel bei *Periplaneta americana* und *Protophormia terraenovae* durchgeführt.

Die Morphologie des Sensillenfeldes auf dem Endglied des Maxillartasters von *Periplaneta americana* wurde von Burry und Moran (1973), Altner und Stetter (1982) und Petryszak (1984) untersucht. Die von diesen Autoren vorwiegend mit dem Raster-Elektronenmikroskop gewonnenen Ergebnisse geben Aufschluß über die Anzahl und die äußere Morphologie der vorhandenen Sensillen. Der Feinbau der Schmeckhaare war hingegen bisher nur unvollständig bekannt. Zwei der Sensillentypen wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Im Aufbau gleichen diese Schmeckhaare bestimmten Sensillen von *Locusta migratoria* (Blaney *et al.*, 1971) sowie von *Gryllus bimaculatus* (Klein, 1982). Die

Maxillartaster beider Arten weisen ebenfalls ein weichhäutiges, distales Sensillenfeld auf, das bei *Gryllus bimaculatus* neun verschiedene Arten von Sinneshaaren trägt (Klein, 1982). Die genaue Funktion dieser Haare ist nicht bekannt, elektrophysiologische Untersuchungen waren nicht erfolgreich (Klein, pers. Mitteilung). Die kurzen Schmeckhaare von *Periplaneta americana* ähneln den als Typ B bezeichneten von *G. bimaculatus*, während die langen dem Typ D oder E entsprechen dürften. Weder bei morphologischen noch bei elektrophysiologischen Untersuchungen fanden sich Hinweise auf Mechanorezeptoren in den Schmeckhaaren von *Periplaneta americana*. Bei den kurzen Schmeckhaaren bestätigt dies die Ergebnisse von Altner und Stetter (1982) sowie von Klein (1982); vermutlich hängt das Fehlen von Mechanorezeptoren mit dem Vorhandensein einer flexiblen Kutikula zusammen, in der die Sensillen verankert sind. Altner (1975) vermutete, daß der Kutikula-Zylinder, der diese Verankerung bewirkt, aus Epikutikula aufgebaut sein könnte. Durch Anlagerung von Weizenkein-Agglutinin-Gold konnte jedoch gezeigt werden, daß der Zylinder Chitin enthält und demnach nicht aus Epikutikula bestehen kann. Der Aufbau der ersten Hüllzelle zeigt die Merkmale, die nach Thurm (1970) für eine Zelle zu erwarten sind, die das transepitheliale Potential aufrecht erhält. Dieses Bestandspotential konnte auch bei beiden Sensillentypen abgeleitet werden.

Das ventrale Sensillenfeld der Maxillartaster von *Periplaneta americana* stellt das wichtigste Geschmacksorgan der Schabe dar (Frings, 1946). Verhaltensversuche haben gezeigt, daß sie damit verschiedene Zucker (Wieczorek, 1978; Jakinovich Jr. *et al.*, 1981), Elektrolyte (Frings, 1946), und einige Aminosäuren (Sugarman und Jakinovich Jr., 1986) wahrnehmen kann. Schaben reagieren positiv auf 0,6 M Glucose, Fructose, Methyl-α-D-Glucose, Maltose und Saccharose, jedoch nicht auf 0,6 M Mannose (Wieczorek, 1978). Die Schwellenwerte - als Maß für die Reizwirksamkeit der verschiedenen Zucker - weisen bei Schaben die gleiche Reihenfolge auf wie bei Fliegen, nämlich Sac > Mal >

Fru > Glc > Gal > Man (vgl. Minnich, 1931). Nach Jakinovich Jr. *et al.* (1981) wirken α-Methyl-D-Glucoside in der Reihenfolge MαD-Glc > MαD-Man > MαD-Gal. Peters (1956) konnte Parallelen zwischen den unterschiedlich hohen Schwellenwerten für Zucker sowie für Kationen und den Affinitäten von Ionenaustauschern zu diesen Substanzen aufzeigen; die erste Bindung der Reizmoleküle könnte an denselben kationischen oder anionischen Gruppen erfolgen, die auch Ionenaustauscher aufweisen (Peters, 1956). Eine weitergehende Analogie, z.B. die Freisetzung von Ionen zur Übertragung des Zuckerreizes, scheint jedoch wegen des gleichzeitigen Auftretens von ionen- und zuckersensitiven Sinneszellen innerhalb eines Haares, wie es bei Fliegen nachgewiesen ist, ausgeschlossen.

Die Insekten reagieren nicht auf künstliche Süßstoffe wie Saccharin, Cyclamat, Thaumatin oder Miraculin (Schoonhoven, 1974). Deshalb ist das Ergebnis der Verhaltensversuche und der elektrophysiologischen Messungen mit Glc-BSA besonders bemerkenswert. Eine Reaktion auf so große Moleküle war bei Insekten-Geschmackssinnesorganen bislang unbekannt. Glc-BSA schmeckt für den Menschen nicht süß (Selbstversuch).

Als Zuckerrezeptor-Proteine bei verschiedenen Schmeißfliegenarten könnten nach Hansen (1974) α-Glucosidasen in Frage kommen. Diese Enzyme konnten aus den tarsalen und labellaren Schmeckhaaren von Fliegen (Koizumi *et al.*, 1973), später auch aus Chemosensillen anderer Insektenarten, z.B. auch aus dem Sensillenfeld von *Periplaneta americana* (Wieczorek, 1978), extrahiert werden. Sie wurden aufgrund gewisser Übereinstimmungen in reaktionskinetischen Eigenschaften, die sich in den Enzymtests und in den Dosis-Antwort-Kurven der Rezeptorzellen zeigten, als membranständige Rezeptorproteine diskutiert (Hansen, 1974; Koizumi *et al.*, 1973 und 1974). Das α-Glucosidase Isoenzym PIID, das die größte Übereinstimmung zeigte, hatte bei *Phormia regina* ein Molekulargewicht von 200 kD (Nakashima *et al.*, 1982), bei *Periplaneta americana* ist kein

Molekulargewicht bekannt. Am Transblot von Maxillartaster-Extrakten von *Periplaneta americana* gibt es eine Bande mit Zuckerbindungsfähigkeit, die ein hohes Molekulargewicht von 100 kD hat. Die Glucosidase könnte bei den vorliegenden Versuchen durch die denaturierenden Bedingungen in ihre Untereinheiten dissoziiert sein oder aber ihre Bindungseigenschaften verloren haben. Die kleinste bei Fliegen bekannte Untereinheit ist 80 kD groß. Nakashima *et al.* (1982) fanden deutliche Unterschiede zwischen den Eigenschaften der Zuckerbindungsstelle und denen des Enzyms; beispielsweise hemmen spezifische Inhibitoren und Aminozucker die α-Glucosidse PIID sehr viel effektiver als die Bindungsstelle, wie sich aus der Rezeptor-Antwort ablesen ließ. α-Glucosidasen kommen als membranständige Rezeptormoleküle demnach kaum noch in Betracht. Ihre Funktion im Schmeckhaar könnte aber sein, Moleküle mit α-ständig gebundenen Zuckerresten durch Freisetzen dieser Zucker als Nahrungsquelle erkennbar zu machen.

Abweichungen von der Michaelis-Menten-Kinetik im Bindungsverhalten von Saccharose veranlaßten Morita (1971, zit. nach Hansen, 1974) zu der Annahme, daß es zwei zuckerbindende Rezeptorsysteme gibt. Simultane Messungen der Impedanz und der Biopotentiale an tarsalen Schmeckhaaren von *Calliphora vicina* zeigten, daß zusätzlich zu Vorgängen an der Dendritenmembran ein "pore transmittance controlling process" existiert (de Kramer und van der Molen, 1980). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Vorstellungen von der Arbeitsweise der Schmeckhaare; sie zeigen, daß im Porenbereich von *Periplaneta americana* und *Protophormia terraenovae* spezifische Zuckerbindungsstellen existieren, die der bislang morphologisch nicht nachweisbaren Bindungsstelle des Dendriten vorgeschaltet sind. Es ist anzunehmen, daß die Ergebnisse der photometrischen Bestimmungen und der Transblots auf Nitrozellulose die Eigenschaften der Porensubstanz widerspiegeln. Der in der Dendritenmembran vermutete Rezeptor dürfte in zu kleinen Mengen vorkommen, als daß er sich mit biochemischen Methoden darstellen

ließe (Hansen, 1974). So konnten auch bestimmte Experimente, deren Ergebnisse auf Modikationen des membranständigen Rezeptors schließen lassen, an der Porensubstanz nicht durchgeführt werden. Leider interpretieren die meisten Autoren ihre Ergebnisse, als beträfen sie die Bindungsstelle in der Dendritenmembran. Nachdem aber drei unterschiedliche experimentelle Ansätze (s.o.) gezeigt haben, daß es sich um ein Zwei-Komponenten-System handelt, ist es schwierig, die Ergebnisse früherer Arbeiten in den richtigen Zusammenhang einzuordnen.

Bei Fliegen ist bekannt, daß nach einer Behandlung mit dem SH-Gruppen-Reagens p-Chloro-mercuri-benzoat keine Antwort der Sinneszellen auf Pyranosen mehr erfolgt; die Antwort auf Furanosen wird nicht beeinträchtigt (Shimada *et al.*, 1974). Die Autoren schließen daraus, daß Pyranosen und Furanosen verschiedene Bindungsorte auf der Dendritenmembran haben. In der Furanoseform sollen dabei vor allem Fructose und Fucose, bedingt auch Mannose und Galaktose gebunden werden (Ninomiya und Shimada, 1976). Es wurde darüberhinaus eine Interaktion von Furanosen mit der auf Wasser reagierenden Sinneszelle nachgewiesen (Wieczorek und Köppl, 1978; Wieczorek, 1980), bei der die Zucker die durch $CaCl_2$ verursachte Blockierung der Zelle aufheben konnten.

Bei Versuchen, die Bindung von Glc-BSA-Gold an labellaren Schmeckhaaren von *Protophormia terraenovae* kompetitiv mit verschiedenen Zuckern zu hemmen, zeigten Galaktose, Mannose und Fructose die schlechtesten Hemmergebnisse. Allerdings dürfte hier kaum eine unterschiedliche Hemmwirkung aufgrund der Furanose- oder Pyranosestruktur vorliegen. Nach den Untersuchungen von Phillips und Vande Berg (1976) können nämlich größere Moleküle, wie etwa Meerrettich-Peroxidase, nicht in das Lumen der labellaren Sensillen eindringen. ^{14}C-markierte Zucker können aber den Porus passieren und anschließend ins Haarlumen und weiter bis in den Kopf der Fliege gelangen (Hanamori, 1976). Die mit Glc-BSA beladenen Goldpartikel mit einem Durchmesser von

17 nm sind viel zu groß, um in das Haarlumen einzudringen, und können deshalb nicht die Bindung am Dendriten demonstrieren. Zudem hatte PCMB nicht den Einfluß auf die Bindung, der nach den Ergebnissen von Shimada *et al.* (1974) zu erwarten gewesen wäre. Die geringe prozentuale Hemmung durch Fructose weist keine Signifikanz auf. Die Werte zeigen eine extrem große Streuung. Der eigentliche Grund für die geringe Hemmwirkung ist nicht zu erkennen. Man könnte vermuten, daß sich der von Omand und Dethier (1969) beobachtete synergistische Effekt von Fructose und Glucose dahingehend auswirkt, daß eine Bindung von Fructose, die an sich eine Hemmung bedeuten würde, eine Bindung von Glc-BSA-Gold nach sich zieht, was die Hemmung zumindest teilweise aufhebt. Hara (1983) konnte mit Dextran und Stärke die Antwort der Zucker-sensitiven Zelle unterdrücken. In Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse ist zu vermuten, daß dieser Effekt das Verhalten der Porensubstanz ausdrückt, zumal das verwendete Dextran mit einem Molekulargewicht von 6.500 kD viel zu groß scheint, um bis zu den Dendriten vordringen zu können. Eigene Hemmversuche mit einem kleineren Dextranmolekül (MG = 4 bis 6 kD) zeigten einen hemmenden Einfluß dieser Molekülart auf die Bindung von Glc-BSA-Gold. Weitere Versuche von Ozaki (1985) mit aktivierter Stärke zeigten vom pH-Wert abhängige Unterschiede im Verhalten der Pyranose- und der Furanose-Bindungsstelle an. Da das Molekulargewicht pflanzlicher Stärke von einigen Tausend bis 500 kD betragen kann, ist es fraglich, inwieweit die beobachteten Effekte das Verhalten der Porensubstanz oder das der Dendritenmembran widerspiegeln.

Der hemmende Einfluß zweiwertiger Ionen auf die Affinität der Bindungsstelle, den Amakawa (1978) feststellte, konnte nicht genauer untersucht werden, da das Glc-BSA-Goldsol in Gegenwart von Ca^{2+} oder Mg^{2+} meist nicht stabil ist. In einem Versuch mit Maxillartastern von *Periplaneta americana*, bei dem das Goldsol stabil blieb, zeigte sich eine geringere Bindung von Glc-BSA-Gold in der Porensubstanz. Eine Umkehrung des Versuchs durch Zusatz von EDTA bzw. EGTA, um den Einfluß zweiwertiger Ionen

eventuell auch bei *Protophormia terraenovae* zeigen zu können, war nicht möglich, da sich auch in Blindversuchen im Porus Silberniederschläge zeigten, vermutlich ausgelöst durch Chelatkomplexe als Kristallisationskeime. Da ATP bzw. cAMP die Zuckerantwort sehr wahrscheinlich im Zusammenhang mit den Membranprozessen beeinflussen (Daley und Vande Berg, 1976; Liscia, 1985), wurde die Bindung von Glc-BSA-Gold in Gegenwart von Nucleotiden nicht untersucht.

Bei Fliegen spielt offensichtlich die Molekülgröße eine bedeutendere Rolle für den Transport zu den Dendriten als dies bei Schaben der Fall ist. Schon Glc-BSA in unmarkierter Form ist, nach den Ergebnissen der Verhaltensversuche, zu groß, um die Dendriten erreichen zu können. Bei Schaben hingegen erfolgt die Diffusion von Glc-BSA, das mit kolloidalem Gold markiert wurde, durch die Porensubstanz hindurch bis ins innere Haarlumen. Dieser Unterschied deutet an, daß das Geschmacksspektrum von Schaben wohl eine etwas größerer Bandbreite haben dürfte als das von Fliegen. Möglicherweise ist bei den im Allgemeinen höher entwickelten Fliegen die Porensubstanz zum Schutz vor Austrocknung weniger durchlässig. Da Glc-BSA bei Schaben eine positive, bei Fliegen aber keine Antwort hervorruft, ist anzunehmen, daß einerseits nicht die bei beiden Tieren vorkommenden α-Glucosidasen als Rezeptormoleküle in Frage kommen und daß andererseits die Aufgabe der Porensubstanz wohl nicht als Übersetzung der Reizinformation in einen "second messenger" gedeutet werden kann, sondern daß die Reizmoleküle bis zur Dendritenmembran befördert werden müssen. Die zweite Deutungsmöglichkeit wäre, daß es bei Geschmackssensillen von Insekten kein allgemein gültiges Funktionsprinzip gibt.

Die Porensubstanz wurde in mehreren elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Schmeckhaaren als elektronendichtes Material beschrieben (Stürckow *et al.*, 1973; Gaffal, 1979; de Kramer und van der Molen, 1984). In den Fällen, in denen man versuchte, sie

histochemisch zu charakterisieren, schien sie stets Proteoglykane zu enthalten (Pietra und Angioy, 1982). Bernays *et al.* (1975) fanden bei *Locusta migratoria* nach Hyaluronidase-Behandlung nur noch in 20% der untersuchten Schmeckhaare eine positive Perjodsäure-Diamin-Reaktion, vermuteten aber, daß Hyaluronsäure nicht der einzige Bestandteil der Porensubstanz ist. Auch die Porensubstanz von *Periplaneta americana* zeigte eine positive PAS-Reaktion und war empfindlich gegen Hyaluronidase. Die Bindungseigenschaften wurden jedoch besonders stark von Pronase beeinflußt. Pietra und Angioy (1982) vermuteten, daß die Porensubstanz einen Filtereffekt ausüben könnte. Diese Annahme dürfte die Verhältnisse allerdings zu sehr vereinfachen, denn die spezifische Zuckerbindungsstelle in der Porensubstanz macht eine reine Filterwirkung unwahrscheinlich. Mit einem Filtereffekt allein ist nicht zu erklären, warum die Versuche, zwischen der chemischen Struktur eines Reizmoleküls und seiner Wirksamkeit eine Beziehung zu konstruieren, kein einheitliches Bild liefern, sondern immer Widersprüchlichkeiten aufweisen (Shimada *et al.*, 1974; Hanamori *et al.*, 1972; Sugarman und Jakinovich Jr., 1986). Die dem Dendriten vorgeschaltete Bindungsstelle in der Porensubstanz könnte für diese Widersprüche verantwortlich sein. Da die Bindungseigenschaften der Porensubstanz enge Beziehungen zur Reizwirksamkeit der Zucker zeigen, kann man vermuten, daß einige Zucker schneller durch den Porus transportiert werden als andere. Über die Mechanismen, mit denen die Porensubstanz aktiv den Transport von Reizmolekülen unterstützt, lassen sich nur Vermutungen anstellen. Möglicherweise sind die Komponenten Hyaluronsäure und Protein auch beide in unterschiedlicher Art und Weise an den Vorgängen im Porus beteiligt. Daß die Porensubstanz bei *Periplaneta americana* aus mindestens zwei Komponenten besteht, zeigt die Extraktion mit Harnstoff, die eine Demaskierung von Bindungsstellen zur Folge hat.

Viele äußere Faktoren können die Sensitivität von Kontaktchemorezeptoren beeinflussen (Blaney *et al.*, 1986). Pietra und Angioy (1982) fanden bei Fliegen Unterschiede in der

Funktionsfähigkeit von Schmeckhaaren in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht der Tiere. Der elektrische Widerstand der Sensillen, der nach Meinung der Autoren mit der Diffusionsmöglichkeit der Reizmoleküle durch die Porensubstanz korreliert ist, ist bei jüngeren Tieren bzw. Weibchen kleiner. Die Autoren vermuten einen Einfluß von Juvenilhormon auf die Produktion der Porensubstanz. Da Juvenilhormon die Bildung von Kutikulaproteinen beeinflußt und diese Proteine im Allgemeinen über Wasserstoff-Brücken mit Chitin - einem Polysaccharid - Bindungen eingehen, sollte diese Hypothese experimentell überprüft werden, sobald die Eigenschaften der Porenproteine so gut untersucht sind, daß eine Nachweismethode mit entsprechender Empfindlichkeit möglich wird. Nach dem elektronenoptischen Bild zu urteilen, liegen die zuckerbindenden Stellen, bei denen es sich vermutlich um Proteine handelt, meist in enger Nachbarschaft zur Kutikula. Auf eine Verwandtschaft zwischen Kutikula und Porensubstanz könnte auch das Vorkommen von Proteoglykanen in den Wachskanälen bei *Periplaneta americana* und *Blaberus craniifer* (Schmitz *et al.*, 1980) hindeuten. Die von Pietra und Angioy (1982) beobachtete Erhöhung des elektrischen Widerstandes der Haarsensillen muß aber nicht an eine Veränderung der Proteinsynthese gekoppelt sein, es könnte z.B. eine Entquellung der Hyaluronsäure durch Wasserverlust oder Anlagerung von Kationen an geladene Gruppen zugrunde liegen.
Die Herkunft der Porensubstanz ist ungewiß. Vermutlich ist eine der Hüllzellen für die Produktion verantwortlich. Bei *Locusta migratoria* soll dies die dritte Hüllzelle sein (Bernays *et al.*, 1975), während bei *Blabera craniifer* die trichogene Zelle der Produktionsort sein soll (Moulins und Noirot, 1972).

2. Besonderheiten der Riechhaare von Insekten

Die am besten untersuchten Sensillen von Insekten sind olfaktorische Sinneshaare auf den Antennen von *Antheraea polyphemus* und *Bombyx mori*, die für Sexualpheromone spezifisch sind (übersicht bei Kaissling, 1986). Diese sind mit

Schmeckhaaren jedoch nur bedingt vergleichbar. Geschmackssinnesorgane reagieren im Allgemeinen auf kleine Moleküle in relativ hoher Konzentration, wobei die Bindung des Reizmoleküls meist noch von Wasser beeinflußt werden kann; sie stehen im Dienst der Ernährung. Geruchssinnesorgane spielen eine Rolle im Sozial- und Sexualverhalten, bei der Eiablage, beim Beutefang oder bei der Warnung vor Feinden. Die Reizmoleküle sind meist größer, weniger hydrophil und kommen oft in sehr niedrigen Konzentrationen vor, ihre Erkennung erfolgt oft mit hoher Spezifität. Ihre Interaktion mit der Bindungsstelle dürfte vom Trägermedium Luft nur wenig beeinflußt werden. Obwohl Schmeckhaare mitunter auf gasförmige Reize reagieren können (Dethier, 1972), ist bei Schmeck- und Riechhaaren nicht derselbe Funktionsmechanismus zu erwarten. Duftmoleküle können leicht auf der lipophilen Kutikula adsorbieren und durch zweidimensionale Diffusion auf ihr transportiert werden (Steinbrecht und Kasang, 1972). So gelangen sie zu einer der zahlreichen Poren in der Sensillenwand. In diesen Poren befinden sich extrazelluläre Porentubuli, die Verbindung zu den Dendriten aufnehmen können (Steinbrecht und Müller, 1971; Steinbrecht, 1973). Möglicherweise erfolgt der Transport der Duftmoleküle durch die Rezeptorlymphe über die Porentubuli, weil sich die hydrophoben Pheromone in der Lymphe nur langsam bewegen können (Kanaujia und Kaissling, 1985). Darauf weist auch hin, daß der Transport von Duftmolekülen in getrockneten Haaren schneller erfolgt als in lebendem Material (Kanaujia und Kaissling, 1985). Übernähmen die Porentubuli den Transport über die Haarwand - über eine Strecke von ca. 1 µm - , so würde dieser nur wenige Millisekunden dauern. Die Moleküle sollen anschließend an der Dendritenmembran binden und elektrische Signale auslösen. Klein und Keil (1984) konnten Dendritenmembranen der Männchen von *Antheraea polyphemus* isolieren und fanden ein Muster von sich wiederholenden, unregelmäßig verteilten Membranstrukturen, die in einer maximalen Dichte von 30.000/μm^2 auftraten. Im Gegensatz dazu fanden Menco und van der Wolk (1982) bei Gefrierbruchuntersuchungen in Riechhaaren von Fliegen nur 1200 Partikel pro

μm^2. Eine ähnliche Partikeldichte findet man auch in olfaktorischen Cilien von Vertebraten (Menco und van der Wolk, 1982). Über die Partikeldichte im distalen Abschnitt von Geschmacksdendriten ist nichts bekannt, im proximalen Teil beträgt sie ca. 200/μm^2 (Menco und van der Wolk, 1982). Untersuchungen wie die von Klein und Keil (1984) sind bei Schaben nicht möglich, weil die Haare nicht isolierbar sind; bei Fliegen scheitern sie an Materialmangel. Die Anwendung der Gefrierbruchtechnik wird durch den doppelten Kutikulazylinder der Schmeckhaare unmöglich gemacht.

Ein besonderes Problem im Funktionsmechanismus von Riechsensillen stellt der Abbau oder Abtransport von Reizmolekülen nach erfolgter Antwort dar. Die Antwort erlischt nach wenigen Sekunden, jedoch können weder die im Sensillum vorkommenden Esterasen noch der teilweise Rücktransport zur Kutikula für diese schnelle Inaktivierung der Duftmoleküle verantwortlich gemacht werden (Kaissling, 1983). Die Rezeptorlymphe enthält große Mengen eines Pheromon-bindenden Proteins mit einem relativ breiten Wirkungsspektrum, das im SDS-Gel ein Molekulargewicht von 15 kD hat (Vogt und Riddiford, 1981). Unter nicht denaturierenden Bedingungen beträgt das Molekulargewicht 30 kD (Hemberger, zit. nach Kaissling *et al.*, 1985); seine Konzentration wird auf 10 mM geschätzt. Dieses Protein könnte an der Inaktivierung beteiligt sein. Diese Zusammenfassung der Funktion von Riechhaaren, wie man sie sich nach den bisherigen Ergebnissen vorstellt, macht einige wichtige Unterschiede zu Schmeckhaaren deutlich, die sich aus den eingangs erwähnten, grundsätzlich unterschiedlichen Anforderungen ergeben. Da die Kutikula der Sinneshaare hydrophob ist, besteht das Hauptproblem bei einem Schmeckhaar in der Überwindung der hydrophoben Kräfte im Porusbereich, um die in Wasser gelösten Reizmoleküle wahrnehmen zu können. Ohne ein Vermittlersystem zwischen den unterschiedlich polaren Stoffen würden vermutlich starke abstoßende Kapillarkräfte im Porus auftreten. Die Kapillareigenschaften von Insektenhaaren dürften bei Chemosensillen für die Funktion besonders wichtig sein. Da die

zum inneren Haarlumen gewandte Oberfläche der Dendritenscheide eine Epikutikulaschicht darstellen soll (Blaney *et al.*, 1971), muß es in der Rezeptorlymphe Substanzen geben, die eine Füllung des Kutikularöhrchens mit Elektrolytlösung überhaupt erst ermöglichen. Hat die Rezeptorlymphe also Kutikula-benetzende Eigenschaften, so ergibt sich der von Phillips und Vande Berg (1976) beschriebene einseitig gerichtete Lymphstrom im Sensillum zwangsläufig durch Einziehen der Sensillenflüssigkeit in die Haarkapillare. Die Porensubstanz dient als Vermittler zwischen Kutikula und von außen angreifenden Flüssigkeiten. Dabei muß sie drei wichtige Aufgaben erfüllen:

1. Überwindung der hydrophoben Eigenschaften der Kutikula;
2. Möglichst geringe Behinderung der Diffusion der Reizmoleküle oder gar eine selektive Unterstützung der Transportvorgänge;
3. Schutz der Dendriten vor Austrocknung.

Für die erste Aufgabe dürften Proteine, entweder mit hydrophobem Abschnitt außen auf der Kutikula adsorbiert oder durch die Epikutikula hindurchragend, die geeignetsten Moleküle sein. Die zweite und dritte Aufgabe erfordern stärker quellbare Substanzen wie z.B. Hyaluronsäuren, die durch Hydratisierung das Tausendfache ihres Trockenvolumens erreichen, also viele Wassermoleküle binden können. Eine derartige Pufferzone würde helfen, Konzentrationsschwankungen in der Rezeptorlymphe zu vermeiden und konstante Arbeitsbedingungen für die Dendriten zu schaffen. Eine selektive Unterstützung der Transportvorgänge erfordert eine für die Reizmoleküle spezifische Bindungsstelle. Der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis einer solchen Bindungsstelle macht diese zusätzliche Funktion der Porensubstanz wahrscheinlich. Vielleicht werden auch durch die chemische Umgestaltung der Porenregion die Kapillarkräfte so ausgenutzt, daß sie den Einstrom von möglichen Nährlösungen beschleunigen. Auch an Stellen, an denen die Kontaktfläche zur Außenwelt stark vergrößert ist, wie bei den kleinen Schmeckhaaren von Schaben, wird auf die Ausbildung von Strukturen, die die Kapillarität erhöhen, nicht verzichtet. Daß der Flüssigkeitsstrom im Haarlumen nicht grundsätzlich von proximal nach distal fließt,

wie Phillips und Vande Berg (1976) annehmen, zeigen die Untersuchungen von Hanamori (1976) bei Fliegen und das Eindringen von markierten Goldpartikeln in das Haarlumen bei Schaben. Diese Befunde zeigen, daß ein Einstrom durch den Porus in das Haar möglich ist.
Während demnach bei Geschmackssensillen die Aufrechterhaltung einer Verbindung des Rezeptorlymphraumes zur Außenwelt unerläßlich ist, ist in Riechhaaren die Überbrückung des Lymphraumes von Vorteil (s.o.). Beide Sensillentypen haben extrazelluläre Tubuli. Wenn diese - wie bei *Locusta migratoria* oder *Schistocerca gregaria* (Blaney und Chapman, 1969) - in großer Zahl auftreten, zeigt sich, daß sie Verbindung zur Kutikulaoberfläche haben. Die funktionelle Bedeutung dieser Tubuli ist jedoch unklar. Denkbar wäre, daß sie am öffnungs- und Schließmechanismus der Poren beteiligt sind (Blaney *et al.*, 1971). Blaney und Chapman (1969) vermuteten, daß die Tubuli an der Verankerung des Sensillums während der Häutung beteiligt sein könnten. Die Verbindungen könnten aber auch die von Rees (1967) und van Drongelen (1979) nach theoretischen Überlegungen geforderten Poren des äußeren Haarlumens sein, die für den elektrischen Stromkreis wichtig sind. Diese Poren sollten nach den Vorstellungen verschiedener Autoren eher das innere mit dem äußeren Haarlumen verbinden; sie konnten aber morphologisch bislang nicht nachgewiesen werden (Gaffal, 1979; de Kramer und van der Molen, 1984). Die Tubuli der Schmeckhaare könnten auch eine Parallelentwicklung zu den Porentubuli der Riechhaare sein oder möglicherweise eine Präadaptation für den Transport lipophiler Moleküle darstellen.

3. Vergleich mit chemischen Sinnesorganen von Wirbeltieren

Die Chemorezeptoren höherer Wirbeltiere sind in den Geschmacksknospen von Zunge und Mundschleimhaut sowie im Riechepithel der Nasenschleimhaut lokalisiert. Die Geschmackssinneszellen sind sekundäre Sinneszellen, die durch Umwandlung von Epithelzellen entstanden sind; sie tragen einen

Mikrovillisaum. Die olfaktorischen Sinneszellen sind primäre Sinneszellen, sie weisen Cilien auf. Beide Sinnesepithelien werden von einer Schleimschicht bedeckt. Die Funktionsweise der für Zucker spezifischen Sensillen stellt man sich prinzipiell ähnlich vor wie bei den Haarsensillen der Insekten, nämlich durch spezifische Anlagerung der Reizmoleküle und eine dadurch hervorgerufene Leitfähigkeitsänderung der Zellmembran. Diese Änderung soll jedoch nicht in der apikalen Zellmembran stattfinden, sondern jenseits der Schlußleiste des Epithels im basalen Bereich. Für die Geschmacksreize der Elektrolyte wird eine Änderung des Oberflächenpotentials oder des Zeta-Potentials diskutiert (Kamo *et al.*, 1974; Kurihara *et al.*, 1978). Elektrokinetische Phänomene können jedoch bei Insekten keine ausreichend großen Rezeptorpotentiale bewirken (Wieczorek, 1980).

Ein zuckerbindendes Protein aus Geschmacksknospen von Rindern konnten erstmals Dastoli und Price (1966) isolieren, dieses Protein hatte ein Molekulargewicht von 150 kD. Cagan (1971) konnte an Homogenaten von circumvallaten und fungiformen Papillen von Rindern zeigen, daß darin eine Bindung von ^{14}C-Saccharose stattfindet, die in Homogenaten filiformer Papillen, die keine Geschmackszellen enthalten, nicht auftritt. Lo (1973) isolierte Plasmamembranen aus Geschmacksknospen von Rindern und wies deren Zuckerbindungsfähigkeit mit ^{14}C-Fructose nach. Weitere Untersuchungen an einem entsprechenden Protein des Hundes zeigten, daß dieses Protein in Gegenwart von Saccharose Konformationsänderungen erfährt (Dastoli, 1974). Diese kurze Zusammenfassung der im Vergleich mit chemosensorischen Haaren von Insekten wichtigen Ergebnisse macht deutlich, daß die Vorstellungen von der Funktion gustatorischer Sinneszellen bei Wirbeltieren viel besser belegt sind als bei den Insekten. Vergleichbare Untersuchungen werden bei Insekten solange nicht möglich sein, bis es entsprechend feine Methoden gibt, die ein Arbeiten mit den winzigen zur Verfügung stehenden Stoffmengen ermöglichen. Trotzdem ist auch bei Wirbeltieren die Bindungsstelle nicht genau lokalisiert, und ebenso wie bei den

Insekten ist der Transduktionsmechanismus unbekannt. Man vermutet eine Beteiligung von SH-Gruppen tragenden Proteinen der Zellmembran, da PCMB die Antwort auf Zucker blockiert (Beidler, 1975). Bei Insekten kann PCMB die Antwort unterdrücken (s.o., Koyama und Kurihara, 1971) oder auch nicht (Mitchell und Gregory, 1979).
Ähnlichkeiten zwischen den Geschmacks- und Geruchsorganen von Wirbeltieren und Insekten bestehen im Reaktionsspektrum der Sinneszellen; sog. Generalisten sind verbreitet, es gibt aber auch ausgesprochene Spezialisten (Boeckh, 1976). Während bei Fliegen einzelne Sinneszellen für die Spezialisierung verantwortlich zu sein scheinen, vermutet Blaney (1975) bei *Locusta migratoria* eine Spezialisierung auf Sensillenebene.

4. Theoretische Aspekte

Die Insekten unterscheiden sich von Wirbeltieren durch eine größere interspezifische Differenz, d.h., verschiedene Arten können offenbar entsprechend ihrer Ernährungsweise auf diese oder jene Zucker stärker reagieren. Darin ist aber kein primitiver Rezeptormechanismus zu sehen, sondern eine in der Evolution aufgetretene Divergenz, ausgehend von einem komplexen Rezeptor (Schoonhoven, 1974). Beide Gruppen reagieren auf Substanzen mit α-glucosidischer Bindung. Während für Insekten die Anwesenheit von drei äquatorialen OH-Gruppen als sog. Glucophore diskutiert wird (Shimada *et al.*, 1974), soll bei Wirbeltieren neben einer schwach sauren Gruppe und einem benachbarten elektronegativen Atom (Shallenberger und Acra, 1967) eine weitere Bindungsstelle vorhanden sein, die über Dispersionskräfte wirkt (Kier, 1976). Dies sind jedoch erst Versuche, zu erklären, wie eine kritische Struktur, die ein Molekül für eine Sinneszelle als Reiz kenntlich macht, aussehen könnte. Eindeutig kennzeichnende Kriterien gibt es bislang nicht (Beets, 1974).

Die Rolle der Schleimschicht, die bei Wirbeltieren das Analogon zur Porensubstanz darstellt, wird als die eines Ionenreservoirs oder -austauschers bzw. eines Filters (Bannister, 1974) gesehen oder auch als Mittel zur Aufrechterhaltung konstanter Arbeitsbedingungen (Vinnikov, 1982). Allgemein ist zu erwarten, daß die Makromoleküle der Schleimschicht die Diffusion der Reizmoleküle behindern (Spragg, 1980). Getchell *et al.* (1980) fanden, daß die 30 bis 50 µm dicke Schleimschicht auf den Riechepithelien des Salamanders *Ambystoma tigrinum* auf diese Weise für die langen Latenzzeiten der olfaktorischen Sinneszellen verantwortlich ist. Die Porensubstanz hingegen scheint die Reizmoleküle nicht zu behindern (s.o.). Getchell *et al.* (1980) haben Hinweise darauf, daß das Rezeptorpotential nicht im distalen, sondern allenfalls im proximalen Teil der Cilien bzw. an der apikalen Zellmembran entsteht. Sie vermuteten, daß sich der entsprechende Generator in der Membran befindet. Für olfaktorische Membranen von Wirbeltieren wurde auch eine Beteiligung der Phospholipide an der Entstehung des Rezeptorpotentials angenommen, da Versuche an Modellmembranen Hinweise in dieser Richtung lieferten (Kurihara *et al.*, 1978). Da bei Wirbeltieren und Insekten modifizierte Cilien an den Sinneszellen auftreten, wurde auch eine Übertragung der Information durch Konformationsänderungen des Tubulins als allgemeines Prinzip diskutiert (Atema, 1973). Einen überzeugenden Hinweis auf die Beteiligung der Cilienstruktur fanden bislang nur Moran *et al.* (1977) an den femoralen Chordotonalorganen von *Melanoplus bivittatus*, also an Mechanorezeptoren. Hier hatte eine Deformation der Cilienspitze eine Krümmung im basalen Bereich der "ciliary necklace" zur Folge, die in Umkehrung der Verhältnisse beim mechanisch aktiven Cilium ein elektrisches Signal erzeugen könnte. Bei Chemosensillen von Fliegen hatte die Behandlung mit Colchizin oder Vinblastin eine Abnahme der Spikerate und der Amplitude der gemessenen Aktionspotentiale zur Folge (Matsumoto und Farley, 1978). Es wurden jedoch bei diesen Versuchen nicht nur die Mikrotubuli, sondern auch die distale Membran des Dendriten

zerstört. Die Struktur der gustatorisch aktiven Dendriten ähnelt der eines sehr stark abgewandelten Ciliums; Epithelzellen von Insekten bilden im Allgemeinen keine Cilien aus. De Kramer und van der Molen (1984) bezweifeln aufgrund von Unterschieden in der Entwicklung beider Strukturen, daß es sich bei den Dendriten um modifizierte Cilien handelt.

5. Ausblick

Die vorliegende Arbeit stellt nur einen Anfang bei der Aufklärung der im Porus stattfindenden Ereignisse dar. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, wo die bei *Periplaneta americana* gefundenen zuckerbindenden Substanzen genau lokalisiert sind. Wenn eine entsprechende Materialmenge gereinigt zur Verfügung stände, wäre eine Lokalisation über die Herstellung von Antikörpern möglich. Außerdem wäre es interessant, weitere künstliche oder natürliche Glykoproteine auf ihre Wirkung im Verhaltensexperiment bzw. elektrophysiologisch zu testen. Eventuell läßt sich auch bei Applikation dieser Substanzen eine Hemmung der Zuckerantwort bei Fliegen beobachten. Vergleiche zu Salzrezeptoren könnten Aufschluß darüber geben, ob die Porensubstanz an der von Blaney (1975) vermuteten Sensillenspezifität beteiligt ist. Wenn es gelänge, Pheromone durch Kopplung an BSA der Goldmarkierung zugänglich zu machen, ohne ihre Struktur zu stark zu modifizieren, ließen sich mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden auch Riechhaare untersuchen. Mit geeigneten Antikörpern z.B. gegen BSA ließe sich eventuell auch die Zuckerbindungsstelle der Dendritenmembran lokalisieren. Durch die Vielseitigkeit, die kolloidales Gold als Marker bietet, eröffnen sich zahlreiche experimentelle Ansätze, die helfen könnten, die Primärprozesse in chemischen Sinnesorganen aufzuklären.

E. Zusammenfassung

Geschmackssensillen der Küchenschabe *Periplaneta americana* und der Schmeißfliege *Protophormia terraenovae* wurden elektronenmikroskopisch, biochemisch sowie verhaltens- und elektrophysiologisch untersucht, um erstmals die primäre Bindungsstelle für Zucker darzustellen.

Die kurzen Schmeckhaare auf dem ventralen Sinnesfeld des Maxillartasters von *Periplaneta americana* haben meist neun Sinneszellen, die gemeinsam von drei Hüllzellen umgeben werden. Die Porenregion an der Haarspitze weist eine komplizierte Gitterstruktur auf, die einen mit Porensubstanz gefüllten Vorhof umgibt. Die Dendriten der Sinneszellen können in diesen Raum hineinragen. Die langen Schmeckhaare auf dem distalen Abschnitt des Sinnesfeldes haben einen einfachen Porus; die Zahl der Dendriten liegt zwischen vier und acht. Ein Mechanorezeptor konnte nicht nachgewiesen werden.

Der Porus der labellaren Schmeckhaare von *Protophormia terraenovae* ist mit einer Reuse aus Kutikulastäbchen gegen das innere Haarlumen abgegrenzt. Die Dendriten der meist vier Sinneszellen enden vor dieser sog. Cupola. Zwischen den Reusenstäbchen und im Porus befindet sich die Porensubstanz.

Mit Neoglykoproteinen, die an kolloidales Gold als Marker gekoppelt sind, können in der Porensubstanz spezifische Zuckerbindungsstellen nachgewiesen werden. Diese zeigen zu verschiedenen Hemmzuckern unterschiedliche Affinitäten. Die Hemmaktivitäten der einzelnen Zucker lassen sich bei *Periplaneta americana* photometrisch und bei *Protophormia terraenovae* an lichtmikroskopischen Präparaten über eine statistische Auswertung quantitativ darstellen. Die Hemmeigenschaften der Zucker in Bezug auf die Bindung von Neoglykoproteinen korrespondieren mit ihrer Reizwirksamkeit im Verhaltensexperiment. Zucker, die schon in geringer Konzentration eine positive Verhaltensantwort auslösen, zeigen meist eine stärkere Hemmwirkung.

Die verwendeten Neoglykoproteine lösen bei *Periplaneta americana* eine positive Verhaltensantwort aus, Glc-BSA wird von den langen

Schmeckhaaren auch elektrisch beantwortet. *Protophormia terraenovae* reagiert im Verhaltensexperiment auf diese Substanzen nicht.

Die Porensubstanz besteht bei *Periplaneta americana* aus einem Proteoglykan sowie aus einem Proteinanteil, der sehr wahrscheinlich die Zuckerbindungsstellen trägt. In gelelektrophoretisch aufgetrennten Extrakten von Maxillartastern zeigen fünf Banden die Fähigkeit, Zucker zu binden, von denen zwei - mit apparenten Molekulargewichten von 40 kD und 45 kD - organspezifisch sind. Eine weitere zuckerbindende Bande mit einem Molekulargewicht von 20 kD kommt sowohl in Maxillartaster- als auch in ZNS-Extrakten vor. Die Bindung von Glc-BSA-Gold ist aber nur beim Maxillartaster-Extrakt spezifisch. Die 45 kD- und die 20 kD-Banden zeigen in Bezug auf die Hemmbarkeit mit verschiedenen Zuckern die beste Übereinstimmung mit den übrigen Befunden.

Die Ergebnisse werden mit bekannten Daten verglichen und ihre Bedeutung für die Funktion gustatorischer Sensillen diskutiert.

F. Literatur

Altner, H. (1975): The microfibre texture in a specialized plastic cuticle area within a sensillum field on the cockroach maxillary palp as revealed by freeze fracturing. Cell Tissue Res. 165, 79 - 88.

Altner, H., Prillinger, L. (1980): Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo-, and hygroreceptors and its functional significance. Int. Rev. Cytol. 67, 69 - 139.

Altner, H., Stetter, H. (1982): Das sensorische System des Maxillartasters der Schabe *Periplaneta americana*. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1982, 247.

Amakawa, T., Kijima, H., Morita, H. (1975): Insoluble α-glucosidases: Possible pyranose site of the sugar receptor of the blowfly, *Phormia regina*. J. Insect Physiol. 21, 1419 - 1425.

Atema, J. (1973): Microtubule theory of sensory transduction. J. theor. Biol. 38, 181 - 190.

Bannister, L.H. (1974): Possible function of mucus at gustatory and olfactory surfaces. In: Transduction Mechanisms in Chemoreception. T.M. Poynder (ed.), Information Retrieval Ltd., London, pp. 39 - 48.

Beets, M.G.J. (1974): Stimulant structure, information and discrimination. In: Transduction Mechanisms in Chemoreception. T.M. Poynder (ed.), Information Retrieval Ltd., London. pp. 129 - 143.

Beidler, L.M. (1955): A theory of taste stimulation. J. Gen. Physiol. 38, 133 - 139.

Beidler, L.M. (1975): Transductive coupling in the gustatory system. In: Functional Linkage in Biomolecular Systems. F.O. Schmitt, D.M. Schneider, D.M. Crothers (eds.), Raven Press, New York. pp. 255 - 262.

Bernays, E.A., Blaney, W.M., Chapman, R.F. (1975): The problems of perception of leaf-surface chemicals by locust contact chemoreceptors. In: Olfaction and Taste V. D.A. Denton, J.P. Coghlan (eds.). Academic Press, New York. pp. 227 - 229.

Blaney, W.M. (1975): Behavioural and electrophysiological studies of the taste discrimination by the maxillary palps of larvae of *Locusta migratoria* L. J. exp. Biol. 62, 555 - 569.

Blaney, W.M., Chapman, R.F. (1969): The fine structure of the terminal sensilla on the maxillary palps of *Schistocerca gregaria*.(Forskål) (Orthoptera, Acrididae). Z. Zellforsch. 99, 74 -97.

Blaney, W.M., Chapman, R.F., Cock, A.G. (1971): The structure of the terminal sensilla on the maxillary palps of *Locusta migratoria* (L.), and changes associated with moulting. Z. Zellforsch. 121, 48 - 68.

Blaney, W.M., Schoonhoven, L.M., Simmonds, M.S.J. (1986): Sensitivity variations in insect chemoreceptors; a review. Experientia 42, 13 - 19.

Boeckh, J. (1976): What can neurophysiology tell us about olfaction? In: Structure-Activity Relationships in Chemoreception. G. Benz (ed.), Information Retrieval Ltd., London. pp. 171 - 178.

Burry, R.W., Moran, D.T. (1973): Sense organs in the cockroach maxillary palp. Naturwissenschaften 60, 521.

Cagan, R.H. (1971): Biochemical studies of taste sensation. I. Binding of ^{14}C-labelled sugars to bovine taste papillae. Biochim. Biophys. Acta 252, 199 - 206.

Dastoli, F.R. (1974): Taste receptor proteins. Life Sciences 14, 1417 - 1426.

Dastoli, F.R., Price, S. (1966): Sweet-sensitive protein from bovine taste buds: Isolation and assay. Science 154, 905.

Daley, D.L., Vande Berg, J.S. (1976): Apparent opposing effects of cyclic AMP and dibutyryl cyclic GMP on the neuronal firing of the blowfly chemoreceptors. Biochim. Biophys. Acta 437, 211 - 220.

Dethier, V.G. (1955): The physiology and histology of the contact chemoreceptors of the blowfly. Q. Rev. Biol. 30, 348 - 371.

Dethier, V.G. (1972): Sensitivity of the contact chemoreceptors of the blowfly to vapors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2189 - 2192.

van Drongelen, W. (1979): Pores in the insect contact-chemosensory hair; a theoretical study. Chem. Senses 4, 117 - 126.

Ernst, K.D. (1972): Die Ontogenie der basiconischen Riechsensillen auf der Antenne von *Necrophorus*. Z. Zellforsch. 129, 217 - 236.

Felt, B.T., Vande Berg, J.S. (1976): Ultrastructure of the blowfly chemoreceptor sensillum (*Phormia regina*). J. Morphol. 150, 763 - 783.

Foelix, R.F. (1972): Permeability of tarsal sensilla in the tick *Amblyomma americanum*. Tissue & Cell 4, 130 - 135.

Frens, G. (1973): Controlled nucleation for the regulation of particle size in monodisperse gold suspensions. Nature: Phys. Sci. 241, 20.

Frings, H. (1946): Gustatory thresholds for sucrose and electrolytes for the cockroach *Periplaneta americana* (Linn.). J. exp. Zool. 102, 23 - 50.

Fryer, P.R., Wells, C., Ratcliffe, A. (1983): Technical difficulties overcome in the use of Lowicryl 4KM EM embedding resin. Histochemistry 77, 141 - 143.

Gaffal, K.P. (1979): An ultrastructural study of the tips of four classical bimodal sensilla with one mechanosensitive and several chemosensitive receptor cells. Zoomorphologie 92, 273 - 291.

Glass II, W.F., Briggs, R.G., Hnlica, L.S. (1981): Use of lectins for detection of electrophoretically separated glycoproteins transferred onto nitrocellulose sheets. Analyt. Biochem. 115, 219 - 224.

Greven, H., Peters, W. (1986): Localization of chitin in the cuticle of Tardigrada using wheat germ agglutinin-gold conjugate as a specific electrondense marker. Tissue & Cell 18, 297 - 304.

Hanamori, T. (1976): Penetration of sugars from the chemosensensory hair tip in the fleshfly. Chem. Senses 2, 229-239.

Hanamori, T., Shiraishi, A., Kijima, H., Morita, H. (1972): Stimulation of labellar sugar taste receptor of the fleshfly by glucosides. Z. vergl. Physiol. 76, 115 - 124.

Hansen, K. (1974): α-Glucosidases as sugar receptor proteins in flies. In: L. Jaenicke (ed.), Mosbacher Kolloquien 25, pp. 207 - 232.

Hansen, K., Heumann, H.-G. (1971): Die Feinstruktur der tarsalen Schmeckhaare der Fliege *Phormia terraenovae* Rob.-Desv. Z. Zellforsch. 117, 419 - 442.

Hara, M. (1983): Competition of polysaccharides with sugars for the pyranose and the furanose sites in the labellar sugar receptor cell of the blowfly, *Phormia regina*. J. Insect Physiol. 29, 113 - 118.

Henke, K. (1953): Über Zelldifferenzierungen im Integument der Insekten und ihre Bedingungen. J. Embryol. Exp. Morphol. 1, 217 - 226.

Hiji, Y., Kobayashi, N., Sato, M. (1971): Sweet-sensitive protein from the rat tongue: its interactions with various sugars. Comp. Biochem. Physiol. 39B, 367 - 375.

Hodgson, E.S., Lettvin, J.Y., Roeder, K.D. (1955): Physiology of a primary chemoreceptor unit. Science 122, 417 - 418.

Horisberger, M. (1979): Evaluation of colloidal gold as a cytochemical marker for transmission and scanning electron microscopy. Biol. Cellulaire 36, 253 - 258.

Horisberger, M., Rosset, J. (1977): Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. J. Histochem. Cytochem. 25, 295 - 305.

Howes, E.A., Leech, C.A. (1985): Organ culture of adult cockroach cns: Ultrastructural and physiological characteristics. Tissue & Cell 17, 141 - 145.

Jakinovich Jr., W., Sugarman, D., Vlahopoulos, V. (1981): Gustatory responses of the cockroach, housefly, and gerbils to methyl glucosides. J. comp. Physiol. 141, 297 - 301.

Kaissling, K.-E. (1986): Transduction processes in olfactory receptors of moths. In: UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Vol. 49, J.Law (ed.), AR Liss Inc., New York, pp. 1 - 11.

Kaissling, K.-E., Klein, U., de Kramer, J.J., Keil, T.A., Kanaujia, S., Hemberger, J. (1985): Insect olfactory cells: Electrophysiological and biochemical studies. In: Molecular Basis of Nerve Activity, Proceedings of the International Symposium in Memory of D. Nachmansohn (Oct. 1984). J.P. Changeux, F. Hucho, A. Maelicke, E. Neumann (eds.), W. de Gruyter & Co., Berlin, New York, pp. 173 - 183.

Kamo, N., Miyoke, M., Kurihara, K., Kobatake, K. (1974): Physicochemical studies of taste receptor. II. Possible mechanism of generation of taste receptor potential induced by salt stimuli. Biochim. Biophys. Acta 367, 11 - 23.

Kanaujia, S., Kaissling, K.-E. (1985): Interactions of pheromone with moth antennae: Adsorption, desorption and transport. J. Insect Physiol. 31, 71 - 81.

Keil, T.A. (1984): Very tight contact of tormogen cell membrane and sensillum cuticle: Ultrastructural basis for high electrical resistance between receptor lymph and subcuticular spaces in silkmoth olfactory hairs. Tissue & Cell 16, 131 - 135.

Kier, L.B. (1976): Theoretical studies on the sweet taste glucophore. In: Structure-Activity Relationships in Chemoreception. G. Benz (ed.), Information Retrieval Ltd, London. pp. 101 - 109.

Kijima, H., Amakawa, T., Nakashima, M., Morita, H. (1977): Properties of membrane-bound α-glucosidases: Possible sugar receptor protein of the blowfly, *Phormia regina*. J. Insect Physiol. 23, 469 - 479.

Klein, U. (1982): Sensilla of the cricket palp. Fine structure and spatial organization. Cell Tiss. Res. 219, 229 - 251.

Klein, U., Keil, T.A. (1984): Dendritic membrane from insect olfactory hairs: Isolation method and electron microscopic observations. Cell. Mol. Neurobiol. 4, 385 - 396.

Koizumi, O., Kijima, H., Kawabata, K., Morita, H. (1973): a-Glucosidase activity on the outside of the labella and legs of the fly. Comp. Biochem. Physiol. 44B, 347 - 356.

Koizumi, O., Kijima, H., Morita, H. (1974): Characterization of α-glucosidase at the tips of the chemosensory setae of the fly, *Phormia regina*. J. Insect Physiol. 20, 925 - 934.

Koyama, N., Kurihara, K. (1971): Modification by chemical reagents of proteins in the gustatory and olfactory organs of the fleshfly and the cockroach. J. Insect Physiol. 17, 2435 - 2440.

Kramer, J.J. de, van der Molen, J.N. (1980): The pore mechanism of contact chemoreceptors in the blowfly, *Calliphora vicina*. In: Olfaction and Taste VII. H. van der Starre (ed.). IRL Press Ltd., London, pp. 61 - 64.

Kramer, J.J. de, van der Molen, L.G. (1984): Development of labellar taste hairs in the blowfly, *Calliphora vicina* (Insecta, Diptera). Zoomorphologie 104, 1 - 10.

Kurihara, K., Kamo, N., Kobatake, J. (1978): Transduction mechanism in chemoreception. Adv. Biophys. 10, 27 - 95.

Larsen, J.R. (1962): The fine structure of the labellar chemosensory hairs of the blowfly, *Phormia regina* Meig. J. Insect Physiol. 8, 683 - 691.

Leydig, F. (1859): Zur Anatomie der Insekten. Arch. Anat. Physiol. 1859, 149 - 183.

Liscia, A. (1985): ATP influences the electrophysiological responses of labellar chemosensilla of *Phormia regina* Meigen (Diptera, Calliphoridae) to salt and sugar stimulation. Monitore Zool. Ital. (N.S.) 19, 39 - 45.

Lo, C.-H. (1973): The plasmamembranes of bovine circumvallate papillae. Isolation and partial characterization. Biochim. Biophys. Acta 291, 650 - 661.

Maes, F.W., Vedder, C.G. (1978): A morphological and electrophysiological inventory of labellar taste hairs of the blowfly *Calliphora vicina*. J. Insect Physiol. 28, 667 - 672.

Matsumoto, D.E., Farley, R.D. (1978): Alterations of ultrastructure and physiology of chemoreceptor dendrites in blowfly tastereceptors treated with vinblastine and colchicine. J. Insect Physiol. 24, 765 - 776.

Minnich, D.E. (1931): The sensitivity of the oral lobes of the proboscis of the blowfly, *Calliphora vomitoria* Linn., to various sugars. J. exp. Zool. 60, 121 - 139.

Mitchell, B.K., Gregory, P. (1979): Physiology of the maxillary sugar sensitive cell in the red turnip beetle, *Entomoscelis americana*. J. comp. Physiol. 132, 167 - 178.

Moeremans, M., Daneels, G., de Mey, J. (1985): Sensitive colloidal metal (gold or silver) staining of protein blots on

nitrocellulose membranes. Analyt. Biochem. 145, 315 - 321.

Moran, D.T., Varela, F.J., Rowley III, J.C. (1977): Evidence for active role of cilia in sensory transduction. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 793 - 797.

Morita, H. (1969): Electrical signs of taste receptor activity. In: III. International Symposium Olfaction and Taste. C. Pfaffmann (ed.), Rockefeller University Press, New York. pp. 370 - 381.

Morita, H. (1972): Properties of the sugar receptor site of the blowfly. In: IV. International Symposium of Olfaction and Taste, D. Schneider (ed.), Wiss. Verlagsges. Stuttgart, pp. 357 - 363.

Morita, H., Yamashita, S. (1959): Generator potential of insect chemoreceptor. Science 130, 922.

Moulins, M., Noirot, C. (1972): Morphological features bearing on transduction and peripheral integration in insect gustatory organs. In: Olfaction and Taste V. D. Schneider (ed.), Wiss. Verlagsges. Stuttgart, pp. 49 - 55.

Nakashima, M., Enomoto, K.-I., Kijima, H., Morita, H. (1982): Discrepancy between the affinities of certain inhibitors for the membrane-bound α-glucosidase and those for the sugar receptor of flies. Insect Biochem. 12, 579 - 585.

Ninomiya, M., Shimada, I. (1976): Stereospecifity for oligosaccharides of two receptor sites in a labellar sugar receptor of the fleshfly. J. Insect Physiol. 22, 483 - 487.

Oakley, B.R., Kirsch, D.R., Morris, N.R. (1980): A simplified ultrasensitive silverstain for detecting proteins in polyacrylamid gels. Analyt. Biochem. 105, 361 - 363.

Omand, E., Dethier, V.G. (1969): An electrophysiological analysis of the action of carbohydrates on the sugar receptor of the blowfly. Proc. Natl. Acad. Sci. 62, 136 - 143.

Otter, C.J. den (1981): Mechanisms of stimulus transduction in chemoreceptors. In: Sense Organs. J. Laverack-Cosens (ed.) Blackie. Glasgow & London, pp. 186 - 215.

Ozaki, M. (1985): Irreversible inhibition of the labellar sugar receptor of the blowfly, *Phormia regina*, by periodate-activated starch. J. Insect Physiol. 31, 631 - 638.

Peters, W. (1956): Experimentelle Untersuchungen zur Wirkungsweise insektenabwehrender Mittel (Repellents). Z. angew. Zool. 43, 1 - 76.

Peters, W. (1965): Die Sinnesorgane an den Labellen von Calliphora erythrocephala Meig. (Diptera). Z. Morph. ökol. Tiere 55, 259 - 320.

Peters, W., Kolb, H., Kolb-Bachofen, V. (1983): Evidence for a sugar receptor (lectin) in the peritrophic membrane of the blowfly larva, *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera). J. Insect Physiol. 29, 275 - 280.

Petryszak, A. (1984): Les organes sensoriels des maxilles et du labium de *Periplaneta americana* (L.). Act. Bio. Cracov. ser. Zool. 22, 85 - 88, (pl. 21 - 23).

Phillips, C.E., Vande Berg, J.S. (1976): Directional flow of sensillum liquor in blowfly (*Phormia regina*) labellar chemoreceptors. J. Insect Physiol. 22, 425 - 429.

Pietra, P., Angioy, A.M. (1982): Mucopolisaccaridi ed elaborazione del messaggio chemosensoriale negli insetti. Riv. Biol. 75, 487 - 502.

Reese, C.J.C. (1967): Transmission of receptor potential in dipteran chemoreceptors. Nature (London) 215, 301 - 302.

Riddiford, L.M. (1970): Antennal proteins of saturniid moths - their possible rôle in olfaction. J. Insect Physiol. 16, 653 - 660.

Rohringer, R., Holden, D.W. (1985): Protein blotting: Detection of proteins with colloidal gold, and of glycoproteins and lectins with biotin-conjugated and enzyme probes. Analyt. Biochem. 144, 118 - 127.

Roth, J., Bendayan, M., Carlemalm. E., Villiger, W., Garavito, M. (1981): Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue. J. histochem. Cytochem. 296, 63 - 67.

Sachs, L. (1978): Angewandte Statistik. Statistische Methoden und ihre Anwendungen. 5. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Schmitz, M.H.J., Stockum, W., Brick, E. (1980): Histochemical demonstration of various ultrastructural components in larval cuticles of the cockroaches *Blaberus craniifer* Burm. and *Periplaneta americana* L. Eur. J. Cell Biol. 22, 187.

Schoonhoven, L.M. (1974): Comparative aspects of taste receptor specifity. In: Transduction Mechanisms in Chemoreception, T.M. Poynder (ed.), Information Retrieval Ltd., London. pp. 190 - 197.

Scott, J.E., Dorling, J. (1969): Periodate oxidation of acid polysaccarides. III. A PAS method for chondroitin sulphates and other glycosamino-glucuronans. Histochemie 19, 295 - 301.

Shallenberger, R.S., Acree, T.E., Lee, C.Y. (1969): Sweet taste of D- and L-sugars and amino acids and the steric nature of their chemo-receptor site. Nature (Lond.) 221, 555-556.

Shimada, I, Shiraishi, A., Kijima, H., Morita, H. (1974): Separation of two receptor sites in a single labellar sugar receptor of the flesh-fly by treatment with p-chloromercuribenzoate. J. Insect Physiol. 20, 605 - 621.

Spindler-Barth, M., Steiner, B., Krahwinkel, R., Spindler, K.-D. (im Druck): Quantitative photometric assay for determination of carbohydrates exposed to cell surfaces, using lectin coated goldsoles. J. Immunol. Meth.

Spragg, S.P. (1980): The Physical Behaviour of Macromolecules with Biological Functions. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto.

Springall, D.R., Hacker, G.W., Grimelius, L., Polak, J.M. (1984): The potential of the immunogold-silver staining method for paraffin sections. Histochemistry 81, 603-608.

Steinbrecht, R.A. (1973): Der Feinbau olfaktorischer Sensillen des Seidenspinners (Insecta, Lepidoptera): Rezeptorfortsätze und reizleitender Apparat. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 137, 533 - 565.

Steinbrecht, R.A. (1980): Cryofixation without cryoprotectants. Freeze substitution and freeze etching of an insect olfactory receptor. Tissue & Cell 12, 73 - 100.

Steinbrecht, R.A., Kasang, G. (1972): Capture and conveyance of odour molecules in an insect olfactory receptor. In: IVth International Symposium Olfaction and Taste, D. Schneider (ed.). pp. 193 - 199. Wiss. Verlagsges. Stuttgart.

Steinbrecht, R.A., Müller, B. (1971): On the stimulus conducting structures in insect olfactory receptors. Z. Zellforsch. 117, 570 - 575.

Stürckow, B., Holbert, P.E., Adams, J.R., Anstead, R.J. (1973): Fine structure of the tip of the labellar taste hair of the blow flies *Phormia regina* (Mg.) and *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera, Calliphoridae). Z. Morph. Tiere 75, 87 - 109.

Sugarman, D., Jakinovich Jr., W. (1986): Behavioural gustatory responses of adult cockroaches, *Periplaneta americana* to D and L amino acids. J. Insect Physiol. 32, 35 - 41.

Thiéry, J.P. (1967): Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microsc. 6, 987 - 1018.

Thurm, U. (1970): Untersuchung zur funktionellen Organisation sensorischer Zellverbände. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1970, pp. 79 - 87. Fischer Verlag, Stuttgart.

Tominaga, Y. (1975): The taste pore of the fleshfly labellar hair. J. Electr. Microsc. 24, 171 - 174.

Vinnikov, Y.A. (1982): Evolution of Receptor Cells. Springer-Verlag, New York.

Vogt, R.G., Riddiford, L.M. (1981): Pheromone binding and inactivation by moth antennae. Nature (Lond.) 293: 161 - 163.

Wieczorek, H. (1978): Biochemical and behavioral studies of sugar reception in the cockroach. J. comp. Physiol. 124, 353 - 356.

Wieczorek, H. (1980): Sugar reception by an insect water receptor. J. comp. Physiol. 138, 167 - 172.

Wieczorek, H. (1982): A biochemical approach to the electrogenic potassium pump of insect sensilla: Potassium sensitive ATPases in the labellum of the fly. J. comp. Physiol. 148, 303 - 312.

Wieczorek, H., Köppl, R. (1978): Effect of sugars on the labellar water receptor of the fly. J. comp. Physiol. 126, 131 - 136

Wieczorek, H., Köppl, R. (1982): Reaction spectra of sugar receptors in different taste hairs of the fly. J. comp. Physiol. 149, 207 - 213 (1982).

van der Wolk, F.M., Koerten, H.K., van der Starre, H. (1984): The external morphology of contact-chemoreceptive hairs of flies and the motility of the tips of these hairs. J. Morphol. 180, 37 - 54.

Zacharuk, R.Y. (1980): Ultrastructure and function of insect chemosensilla. Ann. Rev. Entomol. 25, 27 - 47.

G. Abbildungsteil

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A = Axon
C = Cupola
Ci = ciliärer Dendritenabschnitt
CS = ciliärer Sinus
D = Dendrit der Sinneszelle
dE = differente Elektrode
Di = distaler Dendritenabschnitt
DS = Dendritenscheide
E = Epidermis
eT = extrazelluläre Tubuli
G = Gliazelle
GH = Gelenkhaut
HS = Haarschaft
iE = indifferente Elektrode
K = Kutikula
P = Porus
Pr = proximaler Dendritenabschnitt
R_i = Innenwiderstand
R_{cd} = Widerstand der Dendritenmembran
R_{sz} = Widerstand der Sinneszelle
RLR = Rezeptorlymphraum
S = Sockel
Si = Sinneszelle
So = Soma einer Sinneszelle
SS = Sockelseptum und Aufhängefasern
Th = thecogene Zelle
To = tormogene Zelle
Tr = trichogene Zelle
Ü = Überlappungsbereich der Hüllzellen
V = Vesikel
W = Wurzelfilamente
Z = Verankerungszylinder des Haarschaftes

Abbildung 1

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der untersuchten Geschmacksorgane von Insekten (etwa 100fach vergrößert):

a) Der Maxillartaster der Amerikanischen Küchenschabe, *Periplaneta americana*, trägt auf der Ventralseite ein Sinnesfeld mit zahlreichen kurzen Haarsensillen (inset). An seinem distalen Ende sind längere Sinneshaare zu erkennen.

b) Die Labellen von Schmeißfliegen, hier von *Protophormia terraenovae*, tragen am Rand z.T. sehr lange, apikal gekrümmte Schmeckhaare.

Abb. 1

Abbildung 2

Aufbau der chemosensorischen Haare von *Periplaneta americana* in einer schematischen Darstellung, die für beide Haartypen gilt. Vom Haarschaft ist nur die Basis gezeigt, der Aufbau der Porenregion der kurzen Schmeckhaare ist Abb. 5 zu entnehmen. Der Zellkomplex ist verkürzt dargestellt, die drei verschiedenen Hüllzellen sind durch unterschiedliche Punktraster kenntlich gemacht. Der Übersichtlichkeit halber sind nur zwei der bis zu zehn Sinneszellen dargestellt. Die sog. Gliazelle (G) umgibt die Somata der Sinneszellen (Si), trennt sie aber nicht gegeneinander ab. Zwischen der äußeren Hüllzelle (To) und benachbarten Epidermiszellen (E) sowie zwischen den verschiedenen Hüllzellen sind septierte Desmosomen ausgebildet. Auch dort, wo die Hüllzellen mit sich selbst überlappen, findet man diese Zellhaftstruktur. Der Kontakt zwischen Kutikula (K) und tormogener Zelle (To) im Sockelbereich (S) ist sehr eng, desgleichen der zwischen Dendritenscheide (DS) und thecogener Zelle (Th), so daß vermutlich der Rezeptorlymphraum (RLR) vom Hämolymphraum völlig getrennt ist.

Zum besseren Verständnis der räumlichen Anordnung sind Querschnitte verschiedener Bereiche des Sensillums dargestellt (1 bis 4): 1 Basaler Bereich des Rezeptorlymphraumes, 2 Beginn der Dendritenscheide, 3 ciliärer Abschnitt der Dendriten, 4 proximaler Abschnitt der Dendriten.

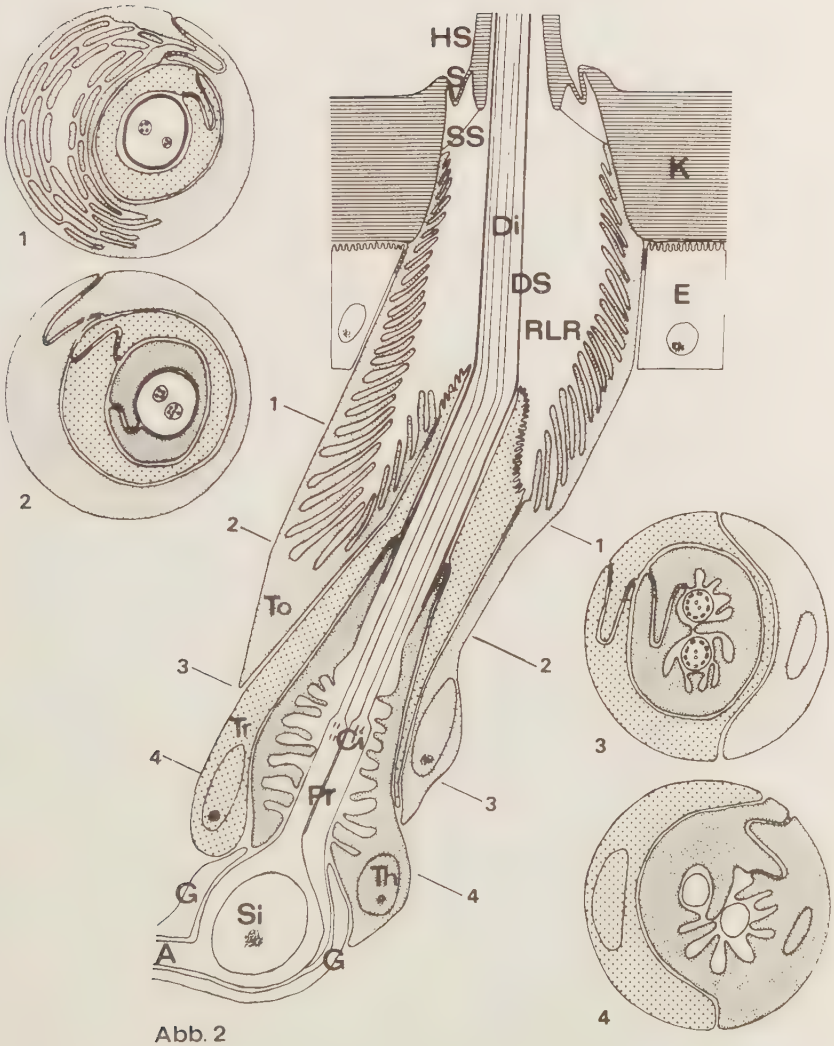


Abb. 2

Abbildung 3

Feinstruktur der langen Schmeckhaare vom distalen Ende des Maxillartasters von *Periplaneta americana*.

a) Der Haarschaft ist über eine Gelenkhaut (GH), ein Sockelseptum (SS) und Aufhängefasern in einem elektronendichten Zylinder (Z) in der weichen Kutikula (K) des Sinnesfeldes verankert. Die tormogene Zelle (To) ragt in diesen Zylinder hinein. Alle Anschnitte stammen von der tormogenen Zelle, die eine ausgedehnte Überlappungszone (ü) ausbildet. S = Sockel, DS = Dendritenscheide, RLR = (äußerer) Rezeptorlymphraum. x 18.000

b) Querschnitt nahe der Haarspitze: Die Dendriten der Sinneszellen ziehen durch den Haarschaft bis in die Nähe des Porus. Im Innern der Dendriten befinden sich Mikrotubuli (Pfeil). x 41.000

c) Zwischen tormogener Zelle (To) und Kutikula ist ein sehr enger Kontakt (Pfeile) ausgebildet. SS = Sockelseptum. x 63.000

d) Darstellung von chitinhaltigen Kutikulabestandteilen mit Weizenkeim-Agglutinin-Gold am unkontrastierten Ultradünnschnitt. Für den Nachweis wurde als Einbettungsmittel ein spezielles, mit Wasser mischbares Methacrylat verwendet, das leider nur eine begrenzte Strukturerhaltung liefert. Außer dem Haarschaft und der Gelenkhaut sind auch der Verankerungszylinder (Z), das Sockelseptum (SS) und die Dendritenscheide (DS) markiert. x 16.000

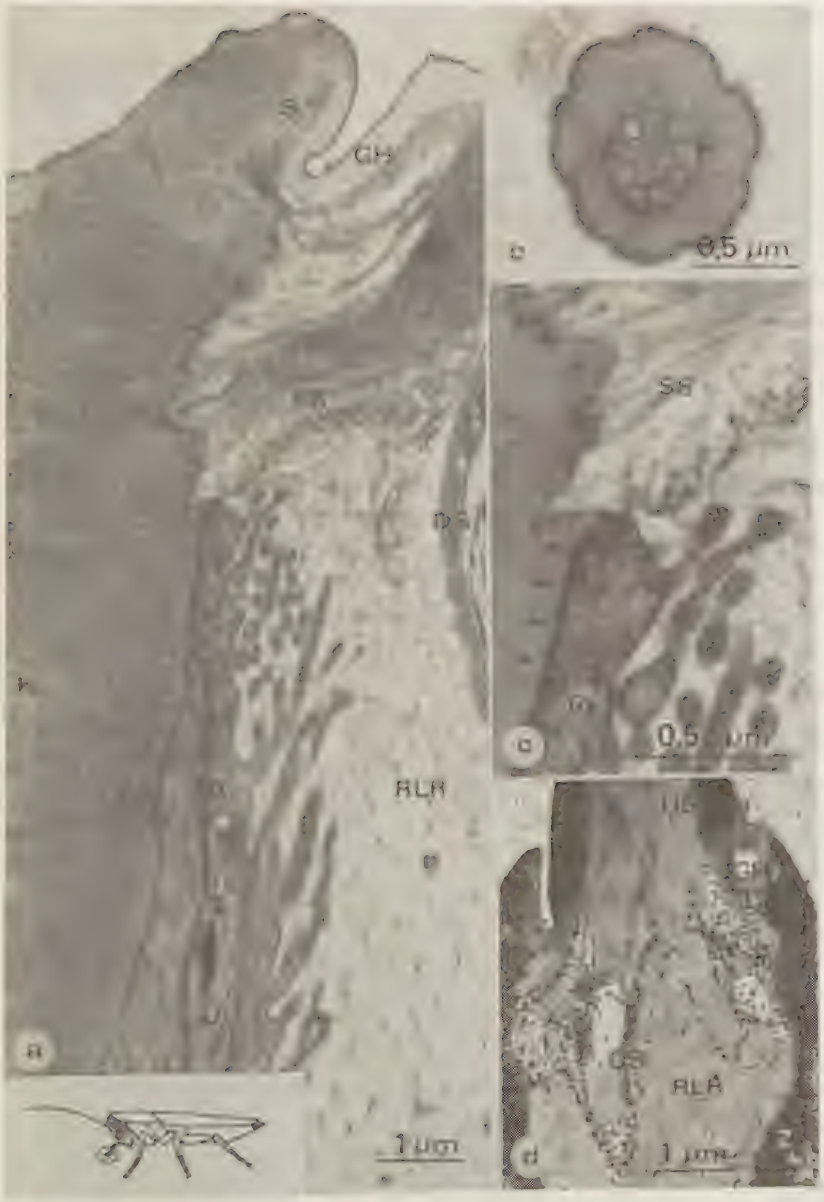


Abb. 3

Abbildung 4

Feinstruktur der kurzen Schmeckhaare auf dem Ventralfeld des Maxillartasters. Maßstäbe = 1 µm

a) Verschiedene Anschnitte eines Sensillums in unterschiedlichen Lagen. Beim lebenden Tier ist der gesamte Komplex aus Sinnes- und Hüllzellen gestreckt, da die weiche Kutikula des Sinnesfeldes durch Hämolymphdruck ausgewölbt wird. Bei der Präparation sinkt die Kutikula ein und die darunterliegenden Sensillenkomplexe werden gestaucht, so daß ein Längsschnitt das nebenstehende Bild ergibt. To = tormogene Zelle, Ü = Überlappungszone der tormogenen Zelle, Tr = trichogene Zelle, Th = thecogene Zelle, V = Vesikel der thecogenen Zelle, DS = Dendritenscheide, D = Dendriten, Ci = ciliärer Abschnitt der Dendriten, CS = ciliärer Sinus, Pr = proximaler Abschnitt der Dendriten. x 10.000

b) Querschnitt durch den Haarschaft. Die Dendritenscheide (DS) teilt das Haarlumen in ein inneres Kompartiment, in dem die Dendriten (D) liegen, und ein äußeres, das meist extrazelluläre Tubuli (eT) enthält. x 22.000

c) Die Dendriten der Sinneszellen gliedern sich in mehrere Abschnitte: Der äußerste Teil, der bis ins Haarlumen zieht, wird als distaler Abschnitt (Di) bezeichnet. In einem Lymphraum (CS), der von der thecogenen Zelle (Th) umschlossen wird, liegt der ciliäre Abschnitt (Ci), im Längsschnitt erkennbar an einer halsartigen Einschnürung des Dendriten und an zwei sog. ciliären Körpern (Pfeile), die im Querschnitt eine 9 x 2 Struktur aufweisen (s. inset). Der zwischen ciliärem Abschnitt und dem Zellkörper liegende Teil des Dendriten wird als proximaler Abschnitt (Pr) bezeichnet. W = Wurzelfilamente, CS = ciliärer Sinus, Th = thecogene Zelle. x 16.000, inset x 48.000

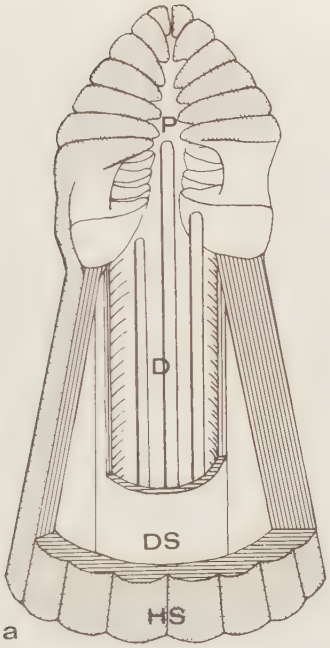
d) Die Somata (So) der Sinneszellen liegen traubenförmig zusammen. Sie stoßen eng aneinander (Pfeile), werden also nicht von der Gliazelle (G) gegeneinander abgeschirmt. Th = thecogene Zelle. x 11.500

Abb. 4

Abbildung 5

a) Schematische Darstellung des Porusbereichs beim kurzen Schmeckhaar von *Periplaneta americana*. Die Außenflächen des Haares sind durch ein Punktraster erkennbar gemacht. Der Haarschaft und die im Innern des Haares liegende Dendritenscheide sind aufgeschnitten, um die Dendriten zu zeigen. Die Schnittflächen sind durch ein Streifenraster gekennzeichnet. Der Porus hat einen Vorhof, der von gekrümmten Kutikulastäben umstanden bzw. überdacht wird. Die Dendriten können bis in den Vorhof reichen, der ganz von der - hier nicht eingezeichneten - Porensubstanz ausgefüllt wird.

b) Schematische Darstellung des Porusbereichs der labellaren Schmeckhaare von *Protophormia terraenovae*. Die Öffnung des Porus wird gegen das Haarlumen, in dem die Dendriten liegen, durch eine Reuse aus Kutikulastäbchen, der sog. Cupola (C, Stürckow *et al.*, 1973), abgegrenzt. Die Dendritenscheide liegt nicht frei, sondern ist auf der ganzen Länge des Haares mit der Haarwand verbunden. Im äußeren Haarlumen befinden sich zahlreiche extrazelluläre Tubuli (eT).



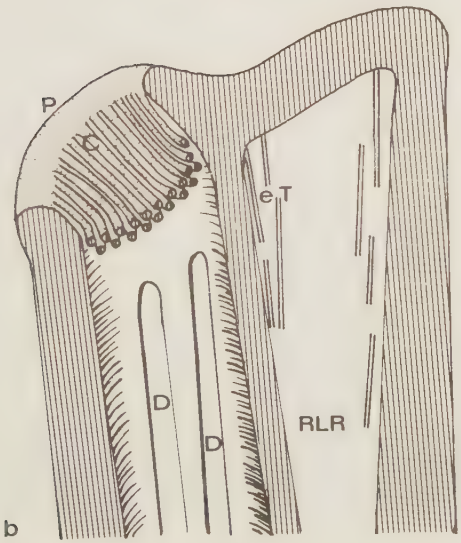


Abb. 5

Abbildung 6

a) Querschnitt durch ein labellares Schmeckhaar von *Protophormia terraenovae*. Die Dendritenscheide (DS) ist auf der ganzen Länge des Haares mit der Haarwand verschmolzen. Im Innern liegen die Dendriten (D) der vier chemosensorischen Sinneszellen. x 20.500

b) Porusbereich eines labellaren Schmeckhaares. Die Cupola besteht aus feinen Kutikulastäbchen, zwischen denen sich die Porensubstanz befindet. In der Porensubstanz wird Glc-BSA-Gold gebunden (Pfeile). eT = extrazelluläre Tubuli. x 89.000

c) Lichtmikroskopische Darstellung der Neoglykoprotein-Gold-Bindung nach Silberlatensifizierung. An der Haarspitze liegt vor dem Porus ein Silberkorn. x 1.500

d) An diesem Haar ist im Gegensatz zu Abb. 6c kein Silberkorn entstanden. x 1.500

e) Zusammenfassende Darstellung der Hemmwirkung verschiedener Zucker auf die Bindung von Glc-BSA-Gold an labellaren Schmeckhaaren von *Protophormia terraenovae*. Als Maß für die Hemmwirkung diente der prozentuale Anteil der Haare, an denen ein Silberkorn entstanden war, die Gesamtheit der ausgezählten Haare entsprach 100%. Für Saccharose ist nicht der Mittelwert, sondern der Median angegeben (s. Tabelle 6).

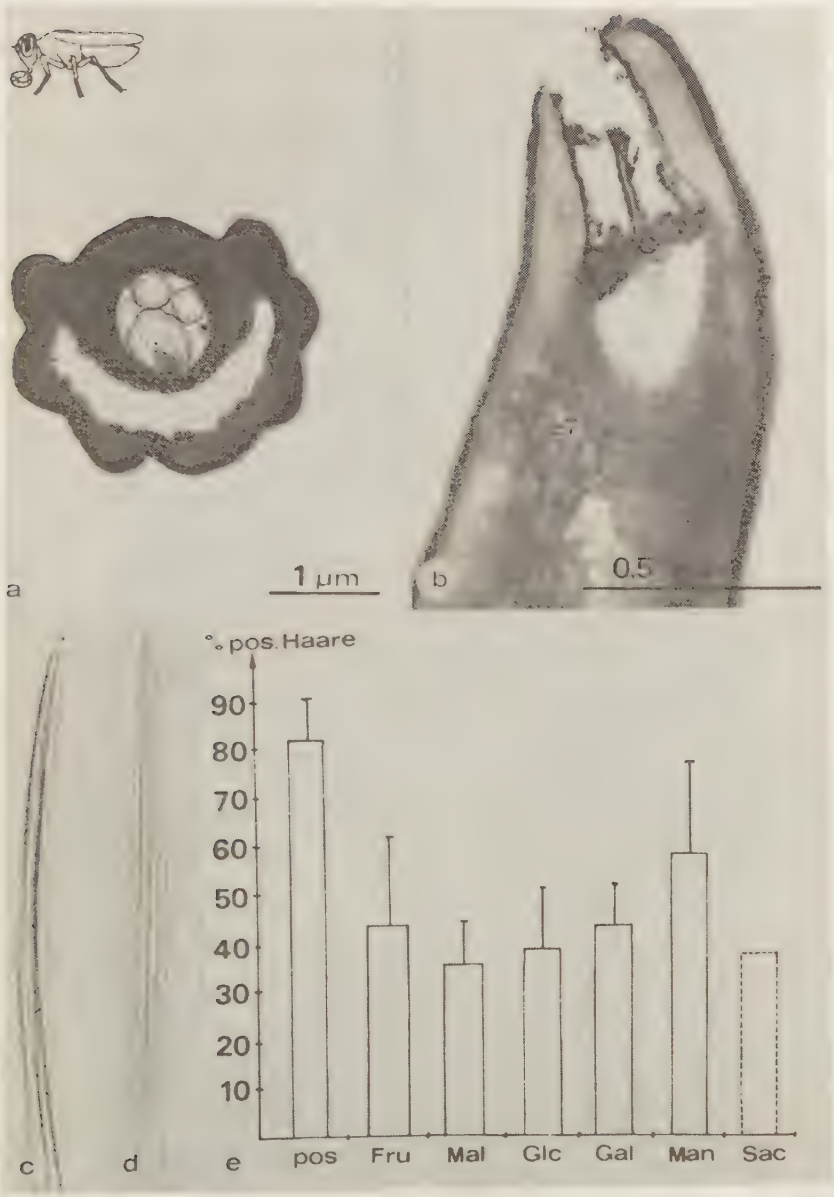

a
1 µm
b
0.5
c
d
e
% pos. Haare
90
80
70
60
50
40
30
20
10
pos
Fru
Mal
Glc
Gal
Man
Sac

Abb. 6

Abbildung 7

Bindung und kompetitive Hemmung verschiedener Neoglykoproteine in der Porensubstanz der kleinen Schmeckhaare von *Periplaneta americana*. x 21.000

a) Glc-BSA-Gold, positiver Versuch. Die Pfeile weisen auf gebundene Neoglykoprotein-Gold-Komplexe.

b) Glc-BSA-Gold, Hemmung mit 0,3 M Glucose

c) Asialofetuin-Gold, positiver Versuch

d) Asialofetuin-Gold, Hemmung mit 0,3 M Galaktose

e) Peroxidase-Gold, positiver Versuch

f) Peroxidase-Gold, Hemmung mit 0,3 M Mannose

g) Peroxidase-Gold, Hemmung mit Glc-BSA

h) Bei Zugabe von Ca^{2+} wird die Bindung von Glc-BSA-Gold geringer.

Abb. 7

Abbildung 8

Chemische Eigenschaften der Porensubstanz der kurzen Schmeckhaare von *Periplaneta americana*. x 21.000

a) Behandlung mit Chondroitinase ABC hat keinen deutlich sichtbaren zerstörenden Einfluß auf die Porensubstanz.

b) Pronase zerstört nicht nur die Porensubstanz, sondern auch die im Haarschaft liegenden Dendriten. Eine Lokalisation der Glc-BSA-Gold-Bindung ist an diesem Material kaum noch möglich; die Bindungseigenschaften der Porensubstanz werden weitgehend zerstört.

c) Hyaluronidase scheint einen Teil der Porensubstanz anzugreifen. Es wird aber noch Glc-BSA-Gold in der verbliebenen Substanz gebunden.

d) Die Inkubation mit 5 mM p-Chloro-mercuri-benzoat zerstört die Bindungsfähigkeit der Porensubstanz nicht.

e) Die Porensubstanz läßt sich mit Triton-X-100 nicht lösen, auch die Bindung von Glc-BSA-Gold wird nicht beeinflußt.

f) Mit 8 M Harnstoff läßt sich offenbar eine Komponente der Porensubstanz extrahieren, wobei zahlreiche zusätzliche Zuckerbindungsstellen freigelegt werden. Die Spezifität dieser Bindungsstellen kann durch kompetitive Hemmung überprüft werden.

g) Natrium-dodecyl-sulfat (SDS) ist ein sehr aggressives Detergens, das außer der Porensubstanz auch die erreichbaren Teile der Sinneszellen zu extrahieren vermag.

h) Doppeloxidation und PAS-Reaktion erzeugen im Porusbereich einen Niederschlag und zeigen so die Anwesenheit von Polysacchariden an.

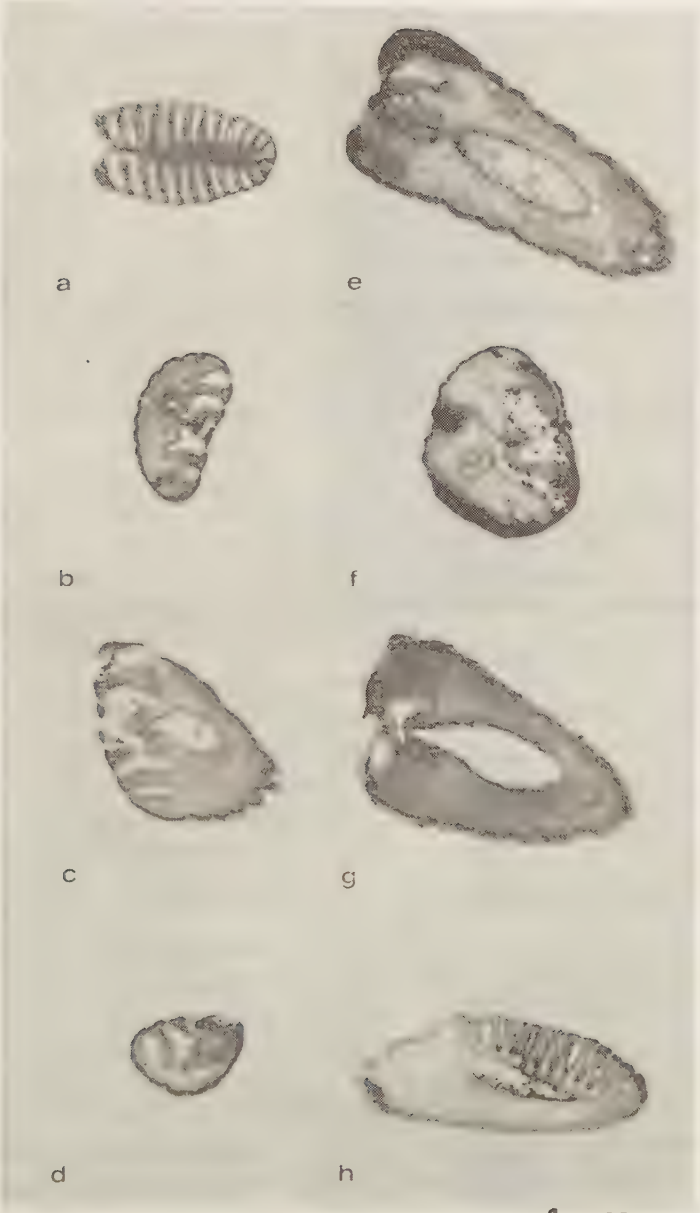


Abb. 8

Abbildung 9

a) Gelelektrophoretische Auftrennung von SDS-Extrakten aus Maxillartastern von *Periplaneta americana*. Nebenstehend die apparenten Molekulargewichte in kD, die mit Hilfe eines Gesamtextraktes des Hautmuskelschlauches von *Lumbricus terrestris* L. als Standard ermittelt wurden.

b) Die Zuckerbindungsfähigkeit der Banden läßt sich - ebenfalls mit Glc-BSA-Gold - testen, wenn man das Material im Anschluß an die Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefolie transferiert und so für die Inkubationslösungen zugänglich macht. Anschließende Silberlatensifizierung läßt die Banden deutlicher hervortreten. Der Folienstreifen ist so abgebildet, daß die Molekulargewichtsreihe auch für ihn gilt.

c) Kompetitive Hemmung der Bindung von Glc-BSA-Gold mit 1 M Saccharose.

d) Kompetitive Hemmung mit 0,3 M Fructose, silberlatensifiziert. Fructose zeigte an elektrophoretisch aufgetrenntem Material eine sehr gute Hemmwirkung. Das zugehörige Densitogramm zeigt deutlich kleinere Peaks als das in Abb. 9e gezeigte, hat aber keine ebene Grundlinie.

f) Hemmung mit 0,3 M Mannose, silberlatensifizierter Blotstreifen und zugehöriges Densitogramm. Die Grundlinie weist eine Drift auf; der erste Peak ist nicht bis zur Basis aufgezeichnet. Bei der Auswertung wurde daher als Maß nicht die Fläche unter den Peaks, sondern ihre Höhe angegeben. Mannose zeigt wie bei allen anderen Versuchen die geringste Hemmwirkung.

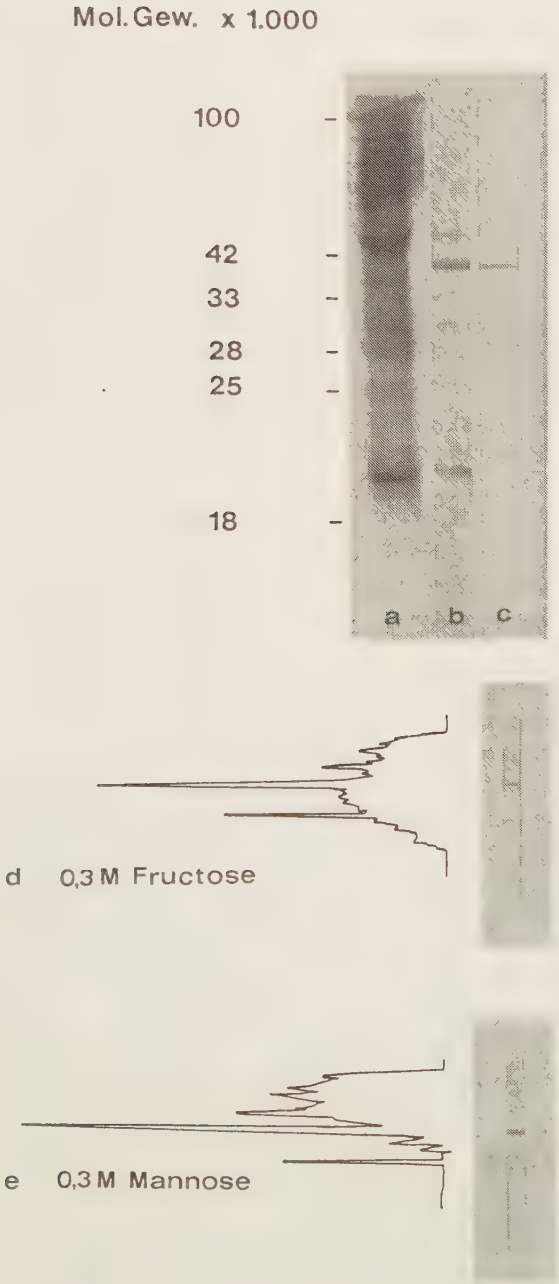

Mol. Gew. x 1.000
100
42
33
28
25
18
a
b
c
d 0,3 M Fructose
e 0,3 M Mannose

Abb. 9

Abbildung 10

Zusammenfassende Darstellung der Hemmwirkung verschiedener Zucker in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Bindung von Glc-BSA-Gold an Nitrozellulose-Transblots von gelelektrophoretisch aufgetrennten SDS-Extrakten aus Maxillartastern von *Periplaneta americana*. In der vorderen Reihe (fein punktiert) sind jeweils die Peakhöhen für die 45 kD-Bande dargestellt, die mittlere Reihe (grob punktiert) gibt die Peakhöhen für die 40 kD-Bande wider und die hintere Reihe (dicht punktiert) zeigt die Peakhöhen der 20 kD-Bande.

a) Zuckerkonzentration 0,3 M

b) Zuckerkonzentration 0,5 M

c) Zuckerkonzentration 1 M

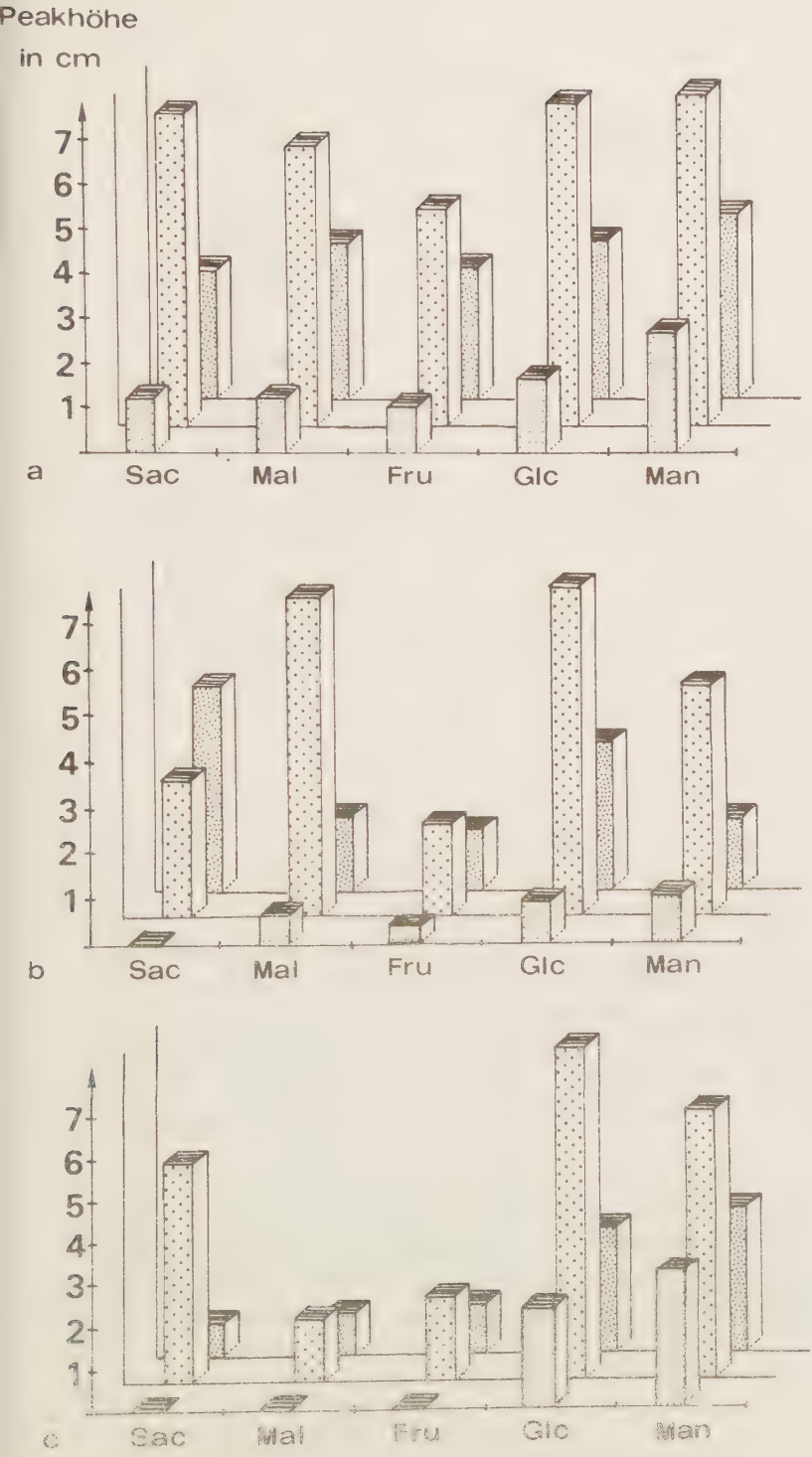
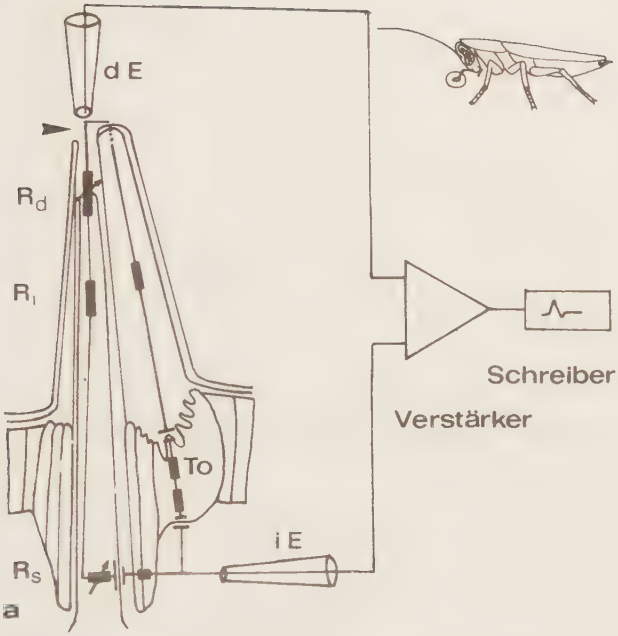

Peakhöhe
in cm
7
6
5
4
3
2
1
a
Sac
Mal
Fru
Glc
Man
b
Sac
Mal
Fru
Glc
Man
c
Sac
Mal
Fru
Glc
Man

Abb. 10

Abbildung 11

a) Ersatzschaltbild eines Kontaktchemorezeptors (verändert n. Thurm, 1970, und van Drongelen, 1979) und Darstellung der Ableitelektroden. Die indifferente Elektrode (iE) diente gleichzeitig als Halter für den Palpus. Die differente Elektrode (dE) ist an der Spitze mit der Reizlösung gefüllt. Durch Überstulpen der Elektrode uber die Haarspitze) wird der Stromkreis geschlossen und gleichzeitig das Haar gereizt. R_i = Innenwiderstand des Dendriten bzw. der Rezeptorlymphe. R_m = veränderlicher Widerstand der Dendritenmembran, R_m = veränderlicher Widerstand der Sinneszelle, To = tormogene Zelle.

b) Graphische Darstellung der Spikeraten-Entwicklung bei der Antwort auf 1 M Saccharose, 1 M Glucose und Glc-BSA in einer Konzentration, die etwa 0,6 M Glucose entspricht. Die Antworten auf Glucose und Glc-BSA stammen vom selben Schmeckhaar.


d E
R_d
R_i
To
i E
R_s
a
Schreiber
Verstärker

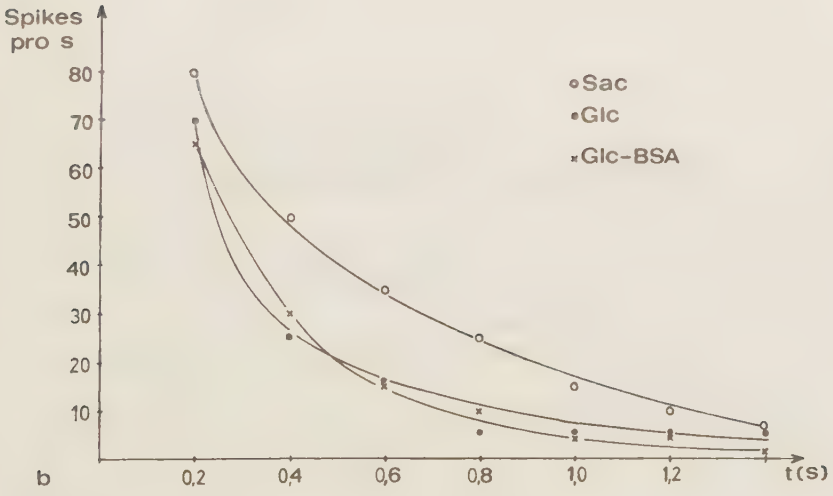

Spikes pro s
80
70
60
50
40
30
20
10
Sac
Glc
Glc-BSA
b
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1,2
t(s)

Abb. 11

Abbildung 12

a) Antwort eines Chemorezeptors von *Periplaneta americana* auf 1 M Glucose. Die obere Spur zeigt die Aktionspotentiale (AC-Signal), die untere das Rezeptorpotential (DC-Signal). Die Ordinate für die obere Spur (s.a. Abb. 12b und c) gibt ebenfalls die Spannung an. Da der Schreiber die Aktionspotentiale nicht in ihrer vollen Amplitude aufzuzeichnen vermag, würde eine Skalierung der Ordinate falsche Werte für die Spike-Amplituden vortäuschen.

b) Antwort desselben Chemorezeptors auf Glc-BSA. Belegung der Spuren s. Abb. 12a.

c) Zum Vergleich aufgezeichnete AC-Signale als Antwort auf 1 M Saccharose und

d) auf Ringerlösung.

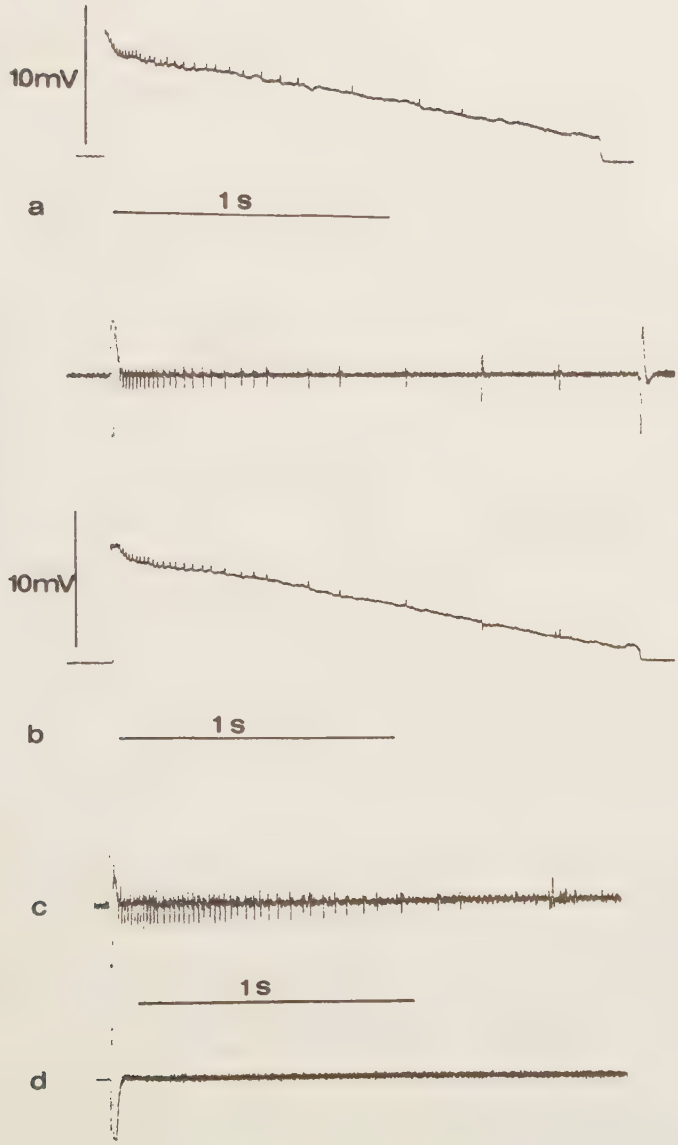
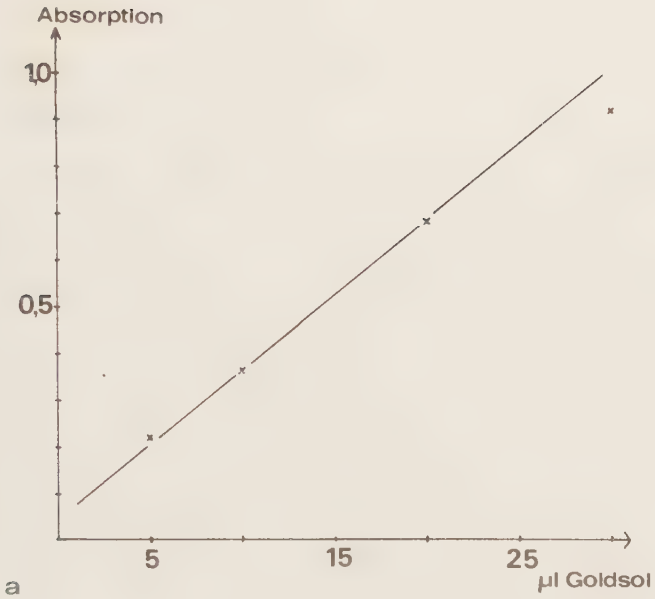


Abb. 12

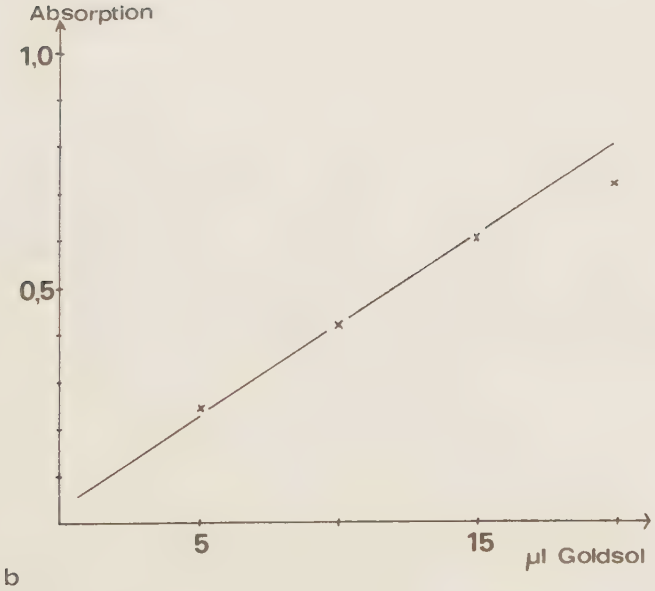
Abbildung 13

a) Unterschiedliche Mengen Goldsol wurden auf Nitrozellulosefolie getrocknet, wieder extrahiert und anschließend die Extinktion bei 520 nm bestimmt. Es ergab sich eine lineare Beziehung; die Absorptionswerte waren fast gleich mit denen parallel angesetzter Goldsolverdünnungen, die nicht auf Nitrozellulose gebracht, sondern direkt gemessen wurden.

b) Eine Goldsolverdünnungsreihe wurde mit Silber latensifiziert und anschließend die Extinktion bei 620 nm gemessen. Die entstandene Silbermenge ist der eingesetzten Goldmenge direkt proportional.


Absorption
1,0
0,5
5
15
25
µl Goldsol

a


Absorption
1,0
0,5
5
15
µl Goldsol

b

Abb. 13

H. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Peters für die Vergabe des Themas und sein stetes Interesse an meinen Ergebnissen, vor allem aber für seine Geduld und seine Diskussionsbereitschaft in schwierigen Phasen der Arbeit. Besonders gefreut habe ich mich über die Hilfe, die ich von Herrn Prof. Dr. K.-E. Kaissling bei der Durchführung der elektrophysiologischen Experimente erhalten habe. Auch seinen Mitarbeitern im MPI Seewiesen gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme im Institut und ihre Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. K.-D. Spindler möchte ich für zahlreiche Ratschläge und Hinweise danken, die mir die Arbeit erleichtert und mein Blickfeld erweitert haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rösen und Frau Hohl vom Diabetes-Institut der Universität Düsseldorf, die mir die Möglichkeit gaben, die Laser-densitometrischen Messungen durchzuführen. Frau Prof. Dr. Kolb-Bachofen danke ich für die Überlassung einer Probe Gal-BSA.

Herrn Prof. Dr. Wendler und Herrn Bollhagen vom Zoologischen Institut der Universität Köln möchte ich dafür danken, daß sie mir bei einem Teil der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen behilflich waren.

Frau Brandstetter von der Firma Thompson-Siegel hat mich mit Schaben versorgt; ihr sowie Herrn Dr. Krehan von der Bayer AG sei an dieser Stelle mein Dank für das Tiermaterial ausgesprochen.

Allen Kolleginnen und Kollegen im Institut für Zoologie II danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit während meiner Doktorandenjahre.

I. Lebenslauf

Name:	Annette Ingrid Becker
geb.:	6. 9. 1957
Adresse:	Speldorfer Str. 12, 4000 Düsseldorf 1
Eltern:	Rolf Becker, * 21. 7. 1925 Erika Becker, geb. Haendeler, * 18. 9. 1927, † 18. 7. 1981
Schulen:	Ostern 1964 bis Sommer 1967, Wichern-Schule in Düsseldorf, Lacombletstr.9. September 1967 bis 1976 Clara-Schumann-Gymnasium in Düsseldorf, Tersteegenstr. 62, Abschluß 1976 mit der allgemeinen Hochschulreife.
Studium:	Vom Wintersemester 1976 bis zum Sommersemester 1981 Studium der Biologie an der Universität Düsseldorf, 1981 Diplom im Fach Biologie.
Promotion:	Seit September 1981 als wissenschaftliche Angestellte der Universität Düsseldorf im Institut für Zoologie II; in dieser Zeit Forschung über das Thema "Lokalisation von Zuckerbindungsstellen an chemosensorischen Haaren von Insekten"; geplanter Abschluß der Promotion im Wintersemester 1986/87.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Düsseldorf, den 1. Januar 1987

Ursula Becker

Druck und Verarbeitung: Dissertations Druck Darmstadt, Tel. 06151/21353